



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 290 046**

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00944977 .8**

(86) Fecha de presentación : **28.06.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1198585**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **24.04.2002**

(54) Título: **Procedimiento para caracterizar un estado biológico, mediante el empleo de perfiles calibrados de expresión génica.**

(30) Prioridad: **28.06.1999 US 141542 P**  
**07.04.2000 US 195522 P**

(73) Titular/es: **Source Precision Medicine, Inc.**  
**2425 North 55th Street, Suite 111**  
**Boulder, Colorado 80301, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.02.2008**

(72) Inventor/es: **Tryon, Victor;**  
**Bevilacqua, Michael, P.;**  
**Bankaitis-Davis, Danute, M. y**  
**Cheronis, John**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2008**

(74) Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para caracterizar un estado biológico, mediante el empleo de perfiles calibrados de expresión génica.

5 **Campo técnico**

Se proporciona un procedimiento para identificar modelos reproducibles de variación de expresión génica que son informativos en virtud del grado de variación observado en un conjunto de datos calibrados. Las variaciones 10 pueden correlacionarse con otras indicaciones no genéticas tales como indicadores clínicos (para seres humanos) de una naturaleza tradicional, pero no se requiere que sean causativos en sí mismos.

**Técnica anterior**

Ha habido una discusión sustancial que incluye audiencias del Congreso (de los EEUU) referentes a errores médicos. Una fuente de errores médicos incluye errores con medicaciones. Se ha documentado que más de 98.000 pacientes 15 hospitalizados anualmente son víctimas de errores de medicación (declaración de la asociación farmacéutica americana a la audiencia del subcomité de educación de trabajo, salud y servicios humanos del comité de aprobaciones del senado sobre errores médicos, 13 de diciembre de 1999). Estos errores incluyen problemas que se producen de interacciones de fármacos para un paciente particular que toma más de un fármaco, problemas referentes a la respuesta de 20 un individuo a un fármaco particular e incorrecta medicación para un estado particular. Además, los errores médicos se producen como resultado de equivocación en el diagnóstico. Esto puede producirse como resultado de técnicas de diagnóstico insensibles o un amplio intervalo de variabilidad interpersonal del modo en que se manifiesta un estado clínico. En la actualidad hay pocas herramientas disponibles para optimizar el pronóstico, diagnóstico y tratamiento 25 de un estado médico que tiene en cuenta el fenotipo y genotipo particular de un individuo.

Ha habido un interés creciente en fármacos herbales o nutracéuticos. Estos se cultivan frecuentemente en países en vías de desarrollo y se someten a poco o ningún control de calidad. Es frecuente el caso de que un lote de un nutracéutico pueda ser eficaz, y que no haya garantía de que un segundo lote será eficaz. Además, el análisis de 30 nutracéuticos es problemático porque estos fármacos son mezclas complejas de las que se sabe poco respecto al principio activo.

Todos los agentes terapéuticos nuevos requieren alguna forma de ensayos clínicos. De hecho, se sabe que un fármaco para tratar tumores que se ha probado en un ensayo clínico usando técnicas de reclutamiento habituales para pacientes sólo puede mostrar eficacia limitada. Si el efecto beneficioso observado en una población clínica es 35 demasiado pequeño, el fármaco no recibirá autorización de la Administración de alimentos y fármacos para uso en la población en general. Sin embargo, el pequeño efecto beneficioso observado puede ser de hecho un artefacto del diseño de ensayos clínicos o el criterio de valoración clínico en la población de pacientes. Sería deseable tener criterios para seleccionar pacientes cuando entran en un ensayo clínico para garantizar que puede detectarse y cuantificarse el efecto beneficioso de un fármaco, si existe.

40 El documento WO98/24935 A1 describe procedimientos para identificar marcadores de estados de enfermedades específicos que se expresan en linfocitos periféricos de patentes en respuesta a un estado de enfermedad a un nivel diferente del que expresan tales marcadores en la sangre periférica de un sujeto normal. El uso de RT-PCR cuantitativa relativa (PCR con transcriptasa inversa) se describe para identificar formas alternativamente cortadas y empalmadas 45 de ARNm de IL-8 que se expresan de manera diferente entre individuos normales e individuos con cáncer de próstata metastásico. Tales formas alternativamente cortadas y empalmadas de ARNm de IL-8 pueden usarse como biomarcadores diagnósticos. En algunas realizaciones, la medición de producto génico de IL-8 en suero puede combinarse con otros marcadores de la enfermedad de la próstata tales como PSA, PAP, HK2, PSP<sub>94</sub> y PSMA<sub>x</sub>.

50 **Resumen de la invención**

Según la presente invención se proporciona un procedimiento para evaluar un estado biológico de un sujeto basado en una primera muestra obtenida a partir del sujeto, proporcionando la muestra una fuente de ARN; caracterizado porque el procedimiento comprende:

55 (a) derivar de la primera muestra un primer conjunto de datos de perfil, primer conjunto de datos de perfil que comprende 3 o más miembros, siendo cada miembro una medida cuantitativa relativa de la cantidad en dicha primera muestra de un constituyente de ARN transcrita distinto en un panel de constituyentes seleccionado tal que la medición de dichos constituyentes permita la evaluación de dicho estado biológico, determinándose la cuantificación relativa de ARNm en dicha muestra mediante la realización de PCR cuantitativa en ARN extraído de la muestra con una eficiencia de amplificación definida para los transcritos diana y determinando la diferencia en ciclos umbral ( $\Delta C_T$ ) entre un marcador de tamaño y los transcritos diana de interés; y

65 (b) producir un conjunto de datos de perfil calibrados para el panel, siendo cada miembro del conjunto de datos de perfil calibrados una función de un miembro correspondiente del primer conjunto de datos de perfil y un miembro correspondiente de un conjunto de datos de perfil de nivel inicial para el panel; en el que el conjunto de datos de perfil calibrados representa un conjunto de valores en el que un modelo de variación se corresponde de un modo reproducible con un estado particular.

En una realización preferida se proporciona un procedimiento para evaluar un estado biológico afectado por un agente, incluyendo el procedimiento: obtener, de una población diana de células a las que se ha administrado el agente, una muestra que tiene al menos una de ARN y proteínas; derivar de la muestra un primer conjunto de datos de perfil, incluyendo el primer conjunto de datos de perfil una pluralidad de miembros, siendo cada miembro una medida 5 cuantitativa de la cantidad de un constituyente de ARN o proteína distinto en un panel de constituyentes seleccionado de tal manera que la medición de los constituyentes permita la medición del estado biológico; y producir un conjunto de datos de perfil calibrados para el panel, en el que cada miembro del conjunto de datos de perfil calibrados es una función de un miembro correspondiente del primer conjunto de datos de perfil y un miembro correspondiente de un 10 conjunto de datos de perfil de nivel inicial para el panel, proporcionado el conjunto de datos de perfil calibrados una medida del estado biológico según se ve afectado por el agente.

En una realización preferida se proporciona un procedimiento para evaluar el efecto en un estado biológico por un primer agente en relación con el efecto de un segundo agente, que incluye: obtener, de la primera y segunda población diana de células a la que se ha administrado respectivamente el primer y segundo agente, la primera y segunda muestra, 15 respectivamente, teniendo cada muestra al menos una de ARN y proteínas; derivar de la primera muestra un primer conjunto de datos de perfil y de la segunda muestra un segundo conjunto de datos de perfil, incluyendo cada conjunto de datos de perfil una pluralidad de miembros, siendo cada miembro una medida cuantitativa de la cantidad de un constituyente de ARN o proteína distinto en un panel de constituyentes seleccionado de tal manera que la medición de los constituyentes permita la medición del estado biológico; y producir para el panel un primer conjunto de datos 20 de perfil calibrados y un segundo conjunto de datos de perfil, en el que (i) cada miembro del primer conjunto de datos de perfil calibrados es una función de un miembro correspondiente del primer conjunto de datos de perfil y un miembro correspondiente de un primer conjunto de datos de perfil de nivel inicial para el panel, y (ii) cada miembro del segundo conjunto de datos de perfil calibrados es una función de un miembro correspondiente del segundo conjunto de datos de perfil y un miembro correspondiente de un segundo conjunto de datos de perfil de nivel inicial para el 25 panel, proporcionando los conjuntos de datos de perfil calibrados una medida del efecto del primer agente en el estado biológico en relación con el efecto del segundo agente.

En una realización preferida se proporciona un procedimiento para realizar un ensayo clínico de un agente, que incluye: producir la administración a ciegas de uno seleccionado de un placebo y el agente a cada candidato de una 30 agrupación de sujetos; y usar expresión génica cuantitativa para monitorizar un efecto de tal administración.

En una realización preferida se proporciona un medio de almacenamiento digital en el que se almacena un conjunto de datos de perfil calibrados legible por ordenador, en el que: el conjunto de datos de perfil calibrados se refiere a una muestra que tiene al menos una de ARN y proteínas derivada de una población de células diana a la que se ha administrado un agente; el conjunto de datos de perfil calibrados incluye una primera pluralidad de miembros, siendo 35 cada miembro una medida cuantitativa de un cambio en una cantidad de un constituyente de ARN o proteína distinto en un panel de constituyentes seleccionado de tal manera que la medición de los constituyentes permita la medición de un estado biológico según se ve afectado por la administración del agente.

En una realización preferida se proporciona un medio de almacenamiento digital en el que se almacena una pluralidad de registros  $R_i$  que se refieren a una población de sujetos, correspondiendo cada registro  $R_i$  a un caso  $P_i$  distinto de un conjunto  $P$  de datos de perfil legibles por ordenador en el que: cada caso  $P_i$  del conjunto  $P$  de datos de perfil se refiere a una muestra distinta derivada de un sujeto, teniendo la muestra al menos una de ARN y proteínas; el conjunto  $P$  de datos de perfil incluye una pluralidad de miembros  $M_j$ , siendo cada miembro  $M_j$  una medida cuantitativa de la 40 cantidad de un constituyente de ARN o proteína distinto en un panel de constituyentes seleccionado de tal manera que la medición de los constituyentes permita la medición de un estado biológico; cada registro  $R_i$  incluye, para cada miembro  $M_{ij}$  de un caso  $P_i$  correspondiente distinto del conjunto  $P$  de datos de perfil, un valor correspondiente al valor 45 del miembro  $M_{ij}$ ; y cada registro  $R_i$  también incluye una referencia a una característica del sujeto respecto al registro, siendo la característica al menos una de grupo de edad, sexo, origen étnico, localización geográfica, alimentación, 50 trastorno médico, indicador clínico, medicación, actividad física, masa corporal y exposición medioambiental.

En una realización preferida se proporciona un medio de almacenamiento digital en el que se almacena un gran número de conjuntos de datos de perfil legibles por ordenador, en el que cada conjunto de datos de perfil se refiere a una muestra derivada de una población de células diana a la que se ha administrado un agente, teniendo la muestra al menos una de ARN y proteínas; cada conjunto de datos de perfil incluye una pluralidad de miembros, siendo cada miembro una medida cuantitativa de la cantidad de un constituyente de ARN o proteína distinto en un panel de constituyentes seleccionado de tal manera que la medición de los constituyentes permita la medición de un estado biológico; y el 55 panel es el mismo para todos los conjuntos de datos de perfil.

En una realización preferida de la invención se proporciona un procedimiento para evaluar un estado biológico de un sujeto, basado en una muestra del sujeto, teniendo la muestra al menos una de ARN y proteínas, incluyendo el procedimiento: derivar de la muestra un primer caso de un conjunto de datos de perfil, incluyendo el conjunto de datos de perfil una pluralidad de miembros, siendo cada miembro una medida cuantitativa de la cantidad de un constituyente de ARN o proteína distinto en un panel de constituyentes seleccionado de tal manera que la medición 60 de los constituyentes permita la medición del estado biológico; y producir un primer caso de un conjunto de datos de perfil calibrados para el panel, en el que cada miembro de un caso del conjunto de datos de perfil calibrados es una función de un miembro correspondiente de un caso del conjunto de datos de perfil y un miembro correspondiente de un caso de un conjunto de datos de perfil de nivel inicial para el panel, proporcionado el conjunto de datos de perfil 65

## ES 2 290 046 T3

calibrados una medida del estado biológico del sujeto; acceder a los datos en una base de datos de estados, teniendo la base de datos de estados una pluralidad de registros que se refieren a una población de sujetos, correspondiéndose cada registro a un caso distinto del conjunto de datos de perfil calibrados; y evaluar el primer caso del conjunto de datos de perfil calibrados en relación con los datos en la base de datos de estados.

5 En una realización preferida de la invención se proporciona un procedimiento para mostrar datos de análisis de expresión génica cuantitativa asociados con la medición de un estado biológico, incluyendo el procedimiento: identificar un primer conjunto de datos de perfil que guarda relación con los datos de análisis de expresión génica, incluyendo el primer conjunto de datos de perfil una pluralidad de miembros, siendo cada miembro una medida cuantitativa de 10 la cantidad de un constituyente de ARN o proteína distinto en un panel de constituyentes seleccionado de tal manera que la medición de los constituyentes permita la medición del estado biológico; producir un conjunto de datos de perfil calibrados para el panel, en el que cada miembro del conjunto de datos de perfil calibrados es una función de un miembro correspondiente del primer conjunto de datos de perfil y un miembro correspondiente de un conjunto de 15 datos de perfil de nivel inicial para el panel, proporcionando el conjunto de datos de perfil calibrados una medida del estado biológico del sujeto; y mostrar el conjunto de datos de perfil calibrados en un formato gráfico.

Una realización preferida se refiere a un registro descriptivo de un cambio en un estado biológico, que incluye: un primer conjunto de valores numéricos de expresión génica para un panel de loci de genes, correspondiendo cada valor en el conjunto a un único locus de gen en un panel de loci de genes, formando el conjunto de valores un conjunto 20 de datos de perfil para una población de células sujetas a un primer estado biológico; un segundo conjunto de valores numéricos de expresión génica para el panel de loci de genes, correspondiendo cada valor en el conjunto a un único locus de gen, formando el conjunto de valores un conjunto de datos de perfil de nivel inicial para una segunda población de células sujetas a un segundo estado biológico, siendo el segundo conjunto de valores opcionalmente una media de 25 múltiples valores de expresión génica de múltiples poblaciones de células para cada locus en el panel; y un tercer conjunto de números correspondiente a la relación del primer conjunto de valores y el segundo conjunto de valores respecto a cada locus de gen en el panel, siendo el tercer conjunto un conjunto de datos de perfil calibrados; siendo el conjunto de datos de perfil y el conjunto de datos de perfil calibrados descriptivos del primer estado biológico respecto al segundo estado biológico.

30 En una realización preferida se proporciona un procedimiento para diagnosticar un estado biológico de un sujeto, que incluye: obtener una muestra de un sujeto; someter una población de células a la muestra y determinar la presencia de un primer estado biológico respecto a un segundo estado biológico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

35 En una realización preferida se proporciona un procedimiento para diagnosticar una susceptibilidad respecto a un estado biológico en un sujeto, que incluye obtener una muestra del sujeto; crear un registro descriptivo, según lo anterior, en el que el conjunto de valores de nivel inicial es una media de segundos valores contenidos en un archivo de 40 registros descriptivos para el segundo estado biológico; conteniendo el archivo una pluralidad de registros descriptivos agrupados según un estado biológico predeterminado; comparar el conjunto de datos de perfil calibrados del sujeto con el archivo de conjuntos de datos de perfil calibrados y diagnosticar la susceptibilidad del sujeto.

En una realización preferida se proporciona un procedimiento para monitorizar el progreso de un estado biológico, que incluye: crear una pluralidad de registros descriptivos, según lo anterior; en el que cada conjunto de primeros 45 valores se determina a intervalos de tiempo preseleccionados respecto al primer registro; comparar cada conjunto de datos de perfil calibrados con un archivo de conjuntos de datos de perfil calibrados, estando agrupada la pluralidad de conjuntos de datos de perfil calibrados según un estado biológico predeterminado; y determinar el progreso del estado biológico respecto a la expresión génica.

50 En una realización preferida se proporciona un procedimiento para establecer la actividad biológica de una composición, que incluye: seleccionar una población de células; someter las células a la composición; y determinar el registro según la descripción anterior usando un conjunto de datos de perfil de nivel inicial normalizado para el estado biológico.

En una realización preferida se proporciona un procedimiento para determinar qué agente terapéutico de elección 55 de una pluralidad de agentes terapéuticos se administra a un sujeto de manera que cambie un estado biológico en un sujeto de un primer estado biológico a un segundo estado biológico; que incluye: someter una muestra del sujeto a cada uno de una pluralidad de agentes terapéuticos; determinar un registro descriptivo para cada una de las muestras según cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, comparar cada uno de los conjuntos de datos de perfil calibrados con un archivo de conjuntos de datos de perfil calibrados, estando agrupado el archivo de conjuntos de datos 60 calibrados según un estado biológico predeterminado; y determinar cuál de los agentes terapéuticos puede cambiar el primer estado biológico en el sujeto al segundo estado biológico en el sujeto.

En una realización preferida se proporciona un procedimiento para caracterizar la eficacia biológica de un único lote de una composición producida por un procedimiento de fabricación que comprende: proporcionar una huella digital o perfil de firma según cualquiera de los procedimientos anteriores; y marcar el lote de la composición colocando la huella digital (perfil de firma) en cada recipiente en el lote.

En una realización preferida se proporciona un procedimiento para acceder a la información biológica en un medio de almacenamiento digital como se describe anteriormente, que incluye: poner la información a disposición de un usuario.

5 En una realización preferida se proporciona un procedimiento para la evaluación por el consumidor de un producto, en el que la evaluación por el consumidor depende de un perfil de firma, que incluye: identificar el producto usando el perfil de firma.

10 En una realización preferida se proporciona un producto de programa informático para evaluar un estado biológico de un sujeto o para evaluar un estado biológico resultante del uso de un agente, que incluye un medio que puede usarse en ordenador que tiene código de programa legible por ordenador en el mismo, el código de programa informático; que incluye: un código de programa para clasificar una muestra del sujeto o el agente para un registro identificable; un código de programa para derivar un primer conjunto de datos, incluyendo el primer conjunto de datos de perfil una pluralidad de miembros, siendo cada miembro una medida cuantitativa de la cantidad de un constituyente de ARN o 15 proteína distinto en un panel de constituyentes seleccionado de tal manera que la medición de los constituyentes permita la medición del estado biológico; estando almacenado el conjunto de datos de perfil en el registro; y un código de programa para producir opcionalmente un conjunto de datos de perfil calibrados para el panel, para almacenamiento en el registro, siendo cada miembro del conjunto de datos de perfil calibrados una función de un miembro correspondiente del primer conjunto de datos de perfil y un miembro correspondiente de un conjunto de datos de perfil de nivel 20 inicial para el panel, proporcionando el conjunto de datos de perfil calibrados una medida del estado biológico del sujeto.

#### Breve descripción de los dibujos

25 Las siguientes características de la invención se entenderán más fácilmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada, tomada con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la fig. 1 es un diagrama que muestra el flujo de información de datos adquiridos en farmacología y toxicología molecular, ensayos clínicos y uso de los datos para la aplicación a medicina individualizada;

30 la fig. 2 es un diagrama que muestra la ruta de descubrimiento de fármacos de nuevos compuestos desde pistas tempranas hasta probables candidatos de fármacos. Aunque los conjuntos de datos de perfil calibrados están indicados en la etapa preclínica, los datos de expresión génica pueden adquirirse y es útil en cualquiera de las fases mostradas. IND se refiere a nuevos fármacos en investigación y se refiere a una fase temprana en revisión reguladora;

35 la fig. 3 es un diagrama que presenta una comparación de protocolos *in vivo* e *in vitro* para formar conjuntos de datos de perfil calibrados para evaluar rápidamente la toxicidad y eficacia de candidatos a producto según varias realizaciones de la presente invención;

40 la fig. 4 es un diagrama que muestra la aplicación de perfiles de expresión génica como una guía para estudios preclínicos y clínicos según una realización de la presente invención;

45 la fig. 5 es un diagrama que muestra un procedimiento según una realización de la presente invención para obtener datos de perfil en ausencia de un estímulo y en presencia de un estímulo;

la fig. 6 es un diagrama que muestra la creación de un archivo de datos de perfil asociados con una pluralidad de sujetos según una realización de la presente invención;

50 la fig. 7 es un diagrama que ilustra la estructura de un registro de datos de perfil según una realización de la presente invención;

la fig. 8 es un diagrama que ilustra una pantalla de entrada de datos para un registro de datos del tipo mostrado en la figura 7 y contextos típicos en los que los registros de datos pueden compilarse según realizaciones de la presente invención;

55 la fig. 9 muestra una realización de la presente invención en la que los datos de perfil, bien en forma bruta o calibrada, se evalúan usando datos de una base de datos a la que se accede remotamente por una red;

la fig. 10 muestra un esquema de un ensayo clínico de fase dos que utiliza perfiles de expresión génica (a). El panel 60 a mano derecha (b) indica que puede usarse la misma información en la fase IV o estudios de poscomercialización para comparar la eficacia de fármacos ya autorizados y comercializados o para guiar la comercialización de tales tratamientos; para guiar la elección de tratamiento para un sujeto individual o población desde dentro de una clase de compuestos apropiados;

65 la fig. 11 es un gráfico de barras que muestra una representación gráfica en forma de un histograma que representa conjuntos de datos de perfil calibrados basados en expresión cuantitativa de ARN en células de una muestra de sangre completa usando un panel de 12 constituyentes en el que cada constituyente se corresponde con un único locus de gen. (a) La muestra de sangre se estimula *ex vivo* con estafilococos destruidos por calor que se exponen adicionalmente a

H7-TPCK, H9-UT-77 o H16-Dex como se indica. El conjunto de datos de perfil de nivel inicial es una muestra de sangre estimulada *ex vivo* (*in vitro*) con estafilococos destruidos por calor. (b) La muestra de sangre se estimula *ex vivo* con lipopolisacárido (LPS) y entonces se expone adicionalmente a compuestos H7-TPCK, H9-UT-77 o H16-Dex como se indica;

5 la fig. 12 es un gráfico de barras con un eje logarítmico que muestra una representación gráfica de conjuntos de datos de perfil calibrados para sangre completa estimulada *ex vivo* con lipopolisacárido (LPS) usando un panel de 9 constituyentes, correspondiendo cada constituyente a un locus de gen que codifica los productos génicos indicados, exponiéndose adicionalmente la sangre a agentes antiinflamatorios: metotrexato, meclofenamato y metilprednisolona.  
10 El conjunto de datos de perfil de nivel inicial se deriva de células estimuladas con LPS (pero por lo demás sin tratar);

15 la fig. 13 son gráficos de barras con un eje logarítmico que muestran una representación gráfica de conjuntos de datos de perfil calibrados para dos muestras diferentes de sangre completa (a) 991116 y (b) 991028 que reflejan el estado biológico de las células usando un panel de 24 miembros, correspondiendo cada miembro con un locus de gen, derivándose el conjunto de datos de perfil de nivel inicial de células sin tratar. Los conjuntos de datos calibrados para células expuestas durante seis horas a tres agentes inductores de la inflamación (lipopolisacárido, estafilococos destruidos por calor y fitohemaglutinina) se comparan para cada muestra. (c) muestra una comparación directa de 991116 estimulada con LPS respecto a 991028 como el conjunto de datos de perfil de nivel inicial (d) muestra una comparación directa entre 991116 y 991028 sin estimular;

20 la fig. 14 es un gráfico de barras con un eje logarítmico que muestra una representación gráfica de conjuntos de datos de perfil calibrados usando un panel de 22 constituyentes, correspondiendo cada constituyente con un locus de gen, derivándose el conjunto de datos de perfil de nivel inicial de células sin tratar. La sangre completa se expone durante seis horas *ex vivo* a tres agentes inductores de la inflamación (lipopolisacárido, estafilococos destruidos por calor y fitohemaglutinina), que entonces se tratan con un único agente antiinflamatorio (metilprednisolona) para revelar similitudes y diferencias en el efecto de un único agente en poblaciones de células que se diferencian en su estado biológico;

25 la fig. 15 es un gráfico de barras con un eje logarítmico que muestra una representación gráfica de conjuntos de datos de perfil calibrados para sangre completa en el que un conjunto de datos calibrados se refiere a un sujeto (sujeto 2) que ha sido tratado *in vivo* con un corticosteroide (dexametasona), un segundo conjunto de datos se refiere al tratamiento de una muestra de sangre del mismo sujeto antes del tratamiento *in vivo*, en el que esa muestra se ha tratado *ex vivo* (*in vitro*), y el tercer conjunto de datos se refiere a un segundo sujeto tratado *in vivo* con dexametasona (sujeto 1). Los conjuntos de datos demuestran la reproducibilidad y predictibilidad de un tratamiento *ex vivo* (*in vitro*) de sangre comparado con tratamiento *in vivo* con el mismo agente. La figura también muestra menor variación entre muestras de diferentes sujetos que reflejan variabilidad interpersonal. Se proporciona un panel de 14 constituyentes. El conjunto de datos de perfil de nivel inicial se deriva de sangre completa sin tratar del sujeto relacionado;

30 la fig. 16 es un gráfico de barras con un eje logarítmico que muestra una representación gráfica de conjuntos de datos de perfil calibrados para sangre completa en el que un conjunto de datos calibrados se refiere a (a) 2 sujetos que han sido tratados *in vivo* con un placebo inactivo durante 3 días y (b) prednisolona activa durante 3 días a 100 mg/día. El conjunto de datos muestra alguna variación entre muestras de diferentes sujetos tratados con el mismo fármaco. Los conjuntos de datos demuestran similitud de respuestas a lo largo de los mismos loci de genes, además de variación cuantitativa en otros loci, sugiriendo variación interpersonal cuantificable. Se proporciona un panel de ocho miembros.  
35 El conjunto de datos de perfil de nivel inicial se deriva de sangre completa sin tratar;

40 la fig. 17 es un gráfico de barras con un eje logarítmico que muestra una representación gráfica de conjuntos de datos de perfil de precisión calibrados para dos muestras tomadas de un único sujeto dentro de un periodo de 19 días usando un panel (por ejemplo, panel de inflamación) de 24 miembros en el que cada miembro se corresponde con un único locus de gen. El conjunto de datos de perfil de nivel inicial se refiere a sangre periférica tomada del sujeto antes del tratamiento;

45 la fig. 18 (a-e) son gráficos de barras con eje logarítmico que muestran una representación gráfica de conjuntos de datos de perfil calibrados para cada uno de 5 sujetos de los que se ha tomado una muestra de sangre. Cada una de las muestras de sangre se expuso al agente inflamatorio fitohemaglutinina (PHA) o a un agente terapéutico (agente antiinflamatorio) a diferentes concentraciones: 0,1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M y 5  $\mu$ M, durante un periodo de 4 horas *ex vivo* (*in vitro*) de manera que se determina la dosis óptima para tratar el sujeto. Correspondiente al loci de 6 genes se usó un panel de 6 constituyentes. El conjunto de datos de perfil de nivel inicial fue muestra sin tratar obtenida del donante relacionado;

50 la fig. 19 es un gráfico de barras con un eje logarítmico que muestra una representación gráfica de conjuntos de datos de perfil calibrados para tres sujetos diferentes que tienen diferentes estados biológicos usando un panel con 24 constituyentes. Los conjuntos de datos de perfil muestran variabilidad según estos estados, proporcionando la base para un panel de firma diagnóstica. (a) muestra un conjunto de datos de perfil calibrados para un fumador frente a un nivel inicial para un no fumador. (b) muestra un conjunto de datos de perfil calibrados para un sujeto con enfermedad pulmonar obstructiva crónica frente a un nivel inicial para un sujeto que no tiene esta enfermedad. El conjunto de datos de perfil de nivel inicial se deriva de un sujeto que es “normal” respecto a estos estados;

la fig. 20 ilustra que una respuesta individual puede distinguirse de una población similarmente tratada. Se proporciona una comparación de la respuesta de un único animal en comparación con su cohorte experimental (n = 5 animales) respecto a un único locus (GST-P). El conjunto de datos de nivel inicial es la media de la cohorte. Las figuras muestran que este animal varió significativamente de la media diaria de la población en los dos primeros días 5 del estudio, pero fue más similar a la media de la cohorte tiempo después del tratamiento con acetaminofeno;

la fig. 21 es un gráfico de barras con un eje logarítmico que muestra una representación gráfica de conjuntos de 10 datos de perfil calibrados para muestras de sangre tratadas *ex vivo* con LPS o LPS y uno de tres herbales antiinflamatorios (equinácea, árnica o ginseng de Siberia) a una concentración de 200 ug/ml. Se usa un panel de 24 constituyentes. El conjunto de datos de perfil de nivel inicial se deriva de células estimuladas con LPS en ausencia de un tratamiento 15 herbal. La figura ilustra la eficacia del uso del perfil de precisión calibrado para investigar los efectos globales de compuestos complejos tales como nutracéuticos cuyo efecto biológico es una suma de más de una actividad. En este caso, cada uno de los herbales se consume como un inmunoestimulante; sin embargo, los perfiles de precisión calibrados revelan un único modelo que muestra una mezcla de efectos tanto inmunoestimulantes como antiinflamatorios;

la fig. 22 es un gráfico de barras con un eje logarítmico que muestra una representación gráfica de conjuntos de 20 datos de perfil calibrados para muestras de sangre tratadas *ex vivo* con LPS o LPS y metilprednisolona o LPS y árnica. El conjunto de datos de perfil de nivel inicial es una muestra de sangre tratada con LPS;

la fig. 23 es un gráfico de barras con un eje logarítmico que muestra una representación gráfica de conjuntos de 25 datos de perfil calibrados para muestras de células THP-1 tratadas con LPS o LPS y árnica a tres concentraciones diferentes usando un panel de 22 constituyentes. El conjunto de datos de perfil de nivel inicial es células THP-1 sin tratar. La figura ilustra una respuesta de concentración respecto a la expresión génica a lo largo del perfil calibrado;

la fig. 24 es un gráfico de barras con un eje logarítmico que muestra una representación gráfica de conjuntos de 30 datos de perfil calibrados para muestras de células THP-1 tratadas *ex vivo* con cuatro tipos comerciales diferentes de equinácea usando un panel de 8 constituyentes. El conjunto de datos de perfil de nivel inicial es células THP-1 sin tratar;

la fig. 25 ilustra el uso del perfil calibrado para comparar la eficacia relativa a lo largo de tipos o diferentes formulaciones. Gráficamente se muestran conjuntos de datos de perfil calibrados para preparaciones herbales de diferentes fuentes de fabricación respecto a una línea celular monocítica indicadora (THP-1), siendo el conjunto de datos de perfil de nivel inicial células THP-1 en ausencia de herbal. (a) tres herbales comerciales. Preparaciones de equinácea a 250 (ug/ml); (b) tres preparaciones herbales a diferentes concentraciones (250 ug/ml, 50 ug/ml y 3-10 ug/ml) (c) 35 cuatro tipos de equinácea comercial a 250 ug/ml).

## Descripción detallada de realizaciones específicas

Como se usa en esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, los siguientes términos deben tener los significados 40 indicados, a menos que el contexto lo requiera de otra manera:

Una “colección de células” es un conjunto de células en el que el conjunto tiene al menos un constituyente.

Una “población de células” incluye una o más células. Una población de células puede referirse a células *in vivo* o 45 a cultivos *in vitro*. Los cultivos *in vitro* pueden incluir cultivos de órganos o cultivos celulares en los que los cultivos celulares pueden ser cultivos celulares primarios o continuos de células eucariotas o procariotas. Las líneas celulares pueden ser cultivos primarios o muestras de células, por ejemplo de un tumor, de sangre o una fracción de sangre, o explantes de biopsia de un órgano, o pueden establecerse líneas celulares o cepas microbianas.

Una “región del sujeto” del que se obtienen proteínas puede ser (pero no se requiere que sea) la misma parte del sujeto del que se ha obtenido una colección de células o una población de células. Tanto las células como las proteínas 50 pueden obtenerse, por ejemplo, de sangre del sujeto. Alternativamente, por ejemplo, las células pueden obtenerse de sangre y las proteínas pueden obtenerse de un raspado de tejido o viceversa. Similarmente, las proteínas pueden obtenerse de orina del sujeto, por ejemplo, mientras que las células pueden obtenerse de cualquier sitio, como por ejemplo de sangre.

Un “panel” de genes es un conjunto de genes que incluye al menos dos constituyentes.

Un estado “normativo” de un sujeto al que va a administrarse una composición significa el estado de un sujeto 60 antes de la administración, aunque el sujeto esté padeciendo por casualidad una enfermedad.

Una “expresión” de un gen incluye el producto génico tanto si el ARN mensajero como la proteína resultan de la traducción del ARN mensajero.

Un “gran número” de conjuntos de datos basado en un panel común de genes es un número de conjuntos de datos 65 suficientemente grande para permitir sacar una conclusión estadísticamente significativa respecto a un caso de un conjunto de datos basado en el mismo panel.

## ES 2 290 046 T3

Un “estado biológico” de un sujeto es el estado del sujeto en un campo pertinente que está bajo observación, y tal campo puede incluir cualquier aspecto del sujeto que pueda monitorizarse para cambio en el estado tal como salud, enfermedad que incluye cáncer; traumatismo; envejecimiento; infección; degeneración de tejidos; etapas de desarrollo; forma física; obesidad o humor. Como puede verse, los estados pueden ser crónicos o agudos o simplemente pasajeros.

5 Ademáis, un estado biológico elegido como diana puede manifestarse por todo el organismo o población de células o puede limitarse a un órgano específico (tal como piel, corazón, ojo o sangre). El término “estado biológico” incluye un “estado fisiológico”.

10 La “administración a ciegas” de uno seleccionado de una composición o placebo a un sujeto en un ensayo clínico implica administrar la composición o placebo al sujeto según un protocolo con arreglo al que el sujeto no está enterado de si la sustancia administrada es la composición o un placebo.

15 Un “organismo” es cualquier célula viva que incluye microorganismos, animales y plantas. Un animal es comúnmente en este contexto un mamífero, pero puede ser un no mamífero vertebrado, como por ejemplo un pez cebra, o un invertebrado, como por ejemplo *Caenorhabditis elegans*.

20 Un “agente” es una composición o un estímulo. Un “estímulo” puede incluir, por ejemplo, ultravioleta A o B, o tratamiento con luz para trastorno afectivo estacional, o tratamiento de psoriasis con psoraleno o tratamiento de melanoma con semillas radioactivas incorporadas, otra exposición a radiación, etc. Una “composición” incluye un compuesto químico, un nutracéutico, una combinación de compuestos o una mezcla compleja.

25 Un “indicador clínico” es cualquier dato fisiológico usado solo o conjuntamente con otros datos para evaluar el estado fisiológico de una colección de células o de un organismo. Este término incluye indicadores preclínicos.

30 35 Un “panel de firma” es cualquier panel que representa una subclase de constituyentes en el que la subclase de constituyentes se selecciona según el nivel de información relativamente alto referente a un estado biológico impartido por cada miembro del conjunto de datos.

30 40 “Constituyente de ARN o proteína distinto” en un panel de constituyentes es un panel que incluye al menos una de ARN y proteína y cada constituyente del panel es distinto.

45 La presente invención engloba la formación de conjuntos de datos calibrados que describen un estado biológico o un efecto de un agente en un estado biológico. Un conjunto de datos calibrados representa un conjunto de valores que se corresponde con las variaciones en expresión génica en el que las variaciones son informativas. Esta aproximación no requiere análisis exhaustivo de toda la expresión génica en células diana asociadas con un estado particular. Tampoco hay necesariamente ningún único locus de gen de importancia particular. Se busca más bien un modelo de variación (un perfil) que se corresponda, de un modo reproducible, con un estado particular. Puede no haber un conocimiento *a priori* de una correlación, sino que una correlación puede establecerse evaluando un panel de constituyentes de tamaño razonable (por ejemplo de hasta 100 constituyentes) y probando iterativamente los perfiles de expresión génica para diferentes sujetos o para el mismo sujeto de los que pueden seleccionarse los loci más informativos para un estado particular. Puede seleccionarse un subgrupo informativo de constituyentes en un panel que varíe consistentemente para un estado particular y entonces este subgrupo puede convertirse en el panel de firma, dando origen el panel de firma a un perfil de firma.

50 55 En otras realizaciones de la invención, cualquier conjunto de datos calibrados para un individuo que tiene más miembros que reflexivos de un único panel de firma puede explotarse para perfiles calibrados que se correspondan con paneles de firma adicionales, proporcionándose así potencialmente nuevas visiones de mecanismos de acción de un estado biológico en conjuntos de genes. La medición de cambios en ARN transcrit en una célula como resultado de un cambio medioambiental o envejecimiento es una medida sumamente sensible de la respuesta de una célula. Las técnicas actualmente disponibles para cuantificar ARN transcrit en una célula añaden sensibilidad a la aproximación. Las realizaciones preferidas de la invención, que se refieren a modelos de cambio en cantidades de ARN transcrit, proporcionan un medio para enfocar e interpretar esta rica información.

60 65 A diferencia de la aproximación anterior, en la técnica anterior se ha dirigido mucha atención a la secuenciación del genoma humano y la identificación de todos los genes codificados en éste. Acompañando a la creciente cantidad de datos de secuencias, las micromatrizes proporcionan un medio para inspeccionar miles de secuencias de genes para mutaciones. Las micromatrizes se están usando para proporcionar perfiles de ADN que identifican mutaciones en un individuo y aquellas mutaciones estarán asociadas con predicciones que se refieren al desarrollo de enfermedad en aquellos individuos. La transcriptómica y proteómica es ahora cada vez más el centro de atención. Estos estudios se refieren a analizar el cuerpo entero del ARN y proteína producido por células vivas. Las micromatrizes proporcionan un procedimiento para analizar muchos miles de ARN humanos diferentes en cuanto a si se expresan y por qué células. Por ejemplo, un proyecto emprendido por el Instituto Nacional del Cáncer y otros para examinar ARNm producidos por diversos tipos de células cancerosas ha revelado 50.000 genes que están activos en uno o más cánceres. El objetivo estos estudios es identificar novedosos fármacos contra el cáncer que están dirigidos a destruir o potenciar la producción de ciertas proteínas. (Kathryn Brown, The Human Genome Business Today, Scientific American, julio de 2000, página 50; Julia Karow, The “Other” Genomes, Scientific American, julio de 2000, página 53; Ken Howard, “The Bioinformatics Gold Rush, Scientific American, julio de 2000, página 58; Carol Ezzell, Beyond the Human Genome, Scientific American, julio de 2000, página 64; todos incorporados

como referencia). Se están realizando grandes esfuerzos por correlacionar la variación genética de individuos y las interrelaciones funcionales de genes en la salud y enfermedad en una variedad de consorcios que incluyen el consorcio de polimorfismo de nucleótido único y el consorcio del epigenoma humano (Beck y col. *Nature Biotechnology* 17 (1999) página 1144). El consorcio del epigenoma planea analizar conjuntos de fragmentos de genoma de individuos tanto sanos como enfermos en los 500 tejidos humanos diferentes (Bioworld International: 22 de diciembre de 1999). Esta aproximación busca correlacionar la expresión absoluta de genes asociados con un estado particular con la presencia de ese estado. Ejemplos de la técnica anterior que buscan medir la expresión génica en cantidades absolutas, incluyendo mediante procedimientos sustractivos o mediante la determinación de cantidades respecto a genes de mantenimiento o eligiendo como diana un único sistema de expresión génica, son los documentos U.S.5.643.765; U.S.5.811.231; U.S.5.846.720; U.S.5.866.330; U.S.5.968.784; U.S.5.994.076; WO97/41261; WO98/24935; WO99/11822; WO99/44063; WO99/46403; WO99/57130; WO00/22172 y WO00/11208.

Se ha tomado una aproximación diferente y novedosa a la anterior para identificar modelos reproducibles de variación de expresión génica que son informativos en virtud del grado de variación entre una muestra y un nivel inicial, por ejemplo un sujeto con el estado y el sujeto que no tiene el estado. Las variaciones pueden correlacionarse con otras indicaciones no genéticas tales como indicadores clínicos (para seres humanos) de una naturaleza tradicional, pero no se requiere que sean causativos en sí mismos. Por consiguiente, la cantidad de producto de expresión génica (por ejemplo transcripto de ARN) producido por un locus de gen en una célula en ciertas condiciones se mide y entonces se almacena como un valor en un primer conjunto de datos de perfil. Este valor se calibra respecto a un segundo valor (un conjunto de datos de perfil de nivel inicial) para proporcionar un miembro de un conjunto de datos de perfil calibrados. Los valores registrados para el conjunto de datos de perfil, basándose en un conjunto particular de datos de nivel inicial para producir un conjunto de datos calibrados, llegan a ser parte del registro descriptivo, almacenándose algunos o todos en una base de datos a la que puede accederse a través de una red global de forma que cualquier dato nuevo en forma de un conjunto de datos de perfil o un conjunto de datos de perfil calibrados medido en cualquier localización global puede compararse directamente con un archivo de registros descriptivos que incluye conjuntos de datos de perfil calibrados y conjuntos de datos de nivel inicial de manera que se amplía el archivo almacenado de perfiles y se proporcionan datos pronósticos o diagnósticos sobre un estado biológico o agente particular.

Se ha ejemplificado el uso de paneles de constituyentes seleccionados correspondientes a loci de genes de los que se mide la expresión génica cuantitativa, por ejemplo midiendo cuantitativamente el ARN transcripto en una muestra de un sujeto, para aplicaciones que incluyen: (a) medición de la eficacia terapéutica de composiciones naturales o sintéticas o estímulos que pueden formularse individualmente o en combinaciones o mezclas para un intervalo de estados fisiológicos elegidos como diana; (b) predicciones de efectos tóxicos y eficacia de dosis de una composición o mezcla de composiciones para un individuo o en una población; (c) determinación de cómo pueden interaccionar dos agentes diferentes administrados en un único tratamiento de manera que se detecte cualquiera de actividad sinérgica, aditiva, negativa, neutra o tóxica; (d) realización de ensayos preclínicos y clínicos proporcionando nuevos criterios para preseleccionar sujetos según conjuntos de datos de perfil informativos para revelar estado de enfermedad y realizar estudios de dosificación preliminares para estos pacientes antes de realizar ensayos de fase 1 ó 2. Los perfiles de expresión génica pueden usarse para reducir los gastos de ensayos clínicos de fase 3 y pueden usarse ensayos más allá de fase 3; (e) marcado de fármacos autorizados; (f) selección de medicación adecuada en una clase de medicaciones para un paciente particular que se refiere a su única fisiología; (g) diagnóstico o determinación de un pronóstico de un estado médico o una infección que puede preceder la aparición de síntomas o alternativamente diagnóstico de efectos secundarios adversos asociados con administración de un agente terapéutico; (h) gestión de la asistencia médica de un paciente; y (i) control de calidad para diferentes lotes de un agente o una mezcla de agentes.

#### 45 *El sujeto*

Los procedimientos en este documento pueden aplicarse a un sujeto que incluye cualquier organismo vivo, en el que un organismo vivo incluye un procariota tal como una bacteria o un eucariota que incluye organismos eucariotas monocelulares en un extremo del espectro y seres humanos en el otro y todo en medio incluyendo plantas. Las figuras se refieren a conjuntos de datos de perfil calibrados obtenidos de seres humanos y mamíferos. No obstante, los procedimientos descritos en este documento pueden aplicarse a células de otro organismo sin la necesidad de demasiada experimentación por un experto en la materia porque todas las células transcriben ARN y en la técnica se conoce cómo extraer ARN de todos los tipos de células.

55 Una muestra de tejido puede incluir una única célula o múltiples células o fragmentos de células. Fluido corporal incluye sangre, orina, fluido espinal, linfa, secreciones de la mucosa, hemolinfa o cualquier otro fluido corporal conocido en la técnica para un sujeto. Para un sujeto animal, una muestra de tejido o fluido puede obtenerse por medio de un aspirado con aguja de biopsia, una muestra de irrigación, raspados e incisiones quirúrgicas u otros medios conocidos en la técnica.

#### *56 Paneles*

Las etapas para seleccionar constituyentes en un panel incluyen buscar bibliografía médica públicamente disponible de ARN o proteínas o conjuntos de ARN o proteínas que varían directa o indirectamente con un estado biológico particular. Pueden seleccionarse un panel que contenga hasta 100 constituyentes. Según el estado que va a examinarse, sólo un pequeño subconjunto de los constituyentes del panel puede ser informativo. En la determinación de la calidad de miembro del panel de genes no es necesario para el panel que sea una selección exhaustiva. Más bien se desea

obtener del panel un perfil de expresión que discrimina sistemáticamente respecto al estado fisiológico o biológico elegido como diana. Además, un panel no se selecciona necesariamente según un perfil esperado de expresión génica en células que responden directamente a un efecto biológico. Por ejemplo, la expresión génica asociada con metabolismo hepático puede analizarse en una muestra de sangre. Las figuras 20 y 22 proporcionan perfiles calibrados de sangre completa tratada con agentes herbales usando marcadores para el metabolismo hepático.

El número de constituyentes en un panel puede variar. Según los ejemplos proporcionados más adelante, se seleccionan paneles de hasta 24 genes para evaluar niveles de expresión. Aunque un panel puede ser de hasta 100 constituyentes, para un panel particular se desea que no tenga más de 24 constituyentes, más particularmente menos de 12 constituyentes. Por ejemplo, se han usado subconjuntos de no más de 8 genes que pueden derivarse de un panel mayor, pero que son suficientemente informativos para efectuar discriminación. El número de constituyentes en un panel para el que se monitoriza expresión puede variar ampliamente dependiendo del contexto. Por ejemplo, la figura 1 describe la adquisición de datos de cultivo celular *in vitro* y de estudios de toxicología animal, que incluye expresión de aproximadamente 25 a 100 o más genes. A diferencia, la selección de marcadores o marcadores sustitutos incluyen, por ejemplo, de tres a 100 genes, preferentemente de cinco a 50 o de cinco a 25 genes que deben analizarse de muestras obtenidas en estudios clínicos. De este modo, los marcadores o marcadores sustitutos que tienen valor pronóstico para un estado médico, tal como una predisposición genética, una respuesta a agente terapéutico, un estado inflamatorio o una infección, etc. pueden identificarse y pueden obtenerse poblaciones crecientes mayores para mejorar las correlaciones. Entonces puede generarse un perfil de salud para un sujeto individual usando un pequeño volumen de muestra de sangre. La muestra de sangre puede analizarse para datos de perfil de expresión de aproximadamente 100 - 500 genes, que comprende marcadores o marcadores sustitutos de varios estados médicos (fig. 1: panel derecho). Si se necesita pueden utilizarse paneles de tamaños variables y las posteriores mejoras en la metodología pueden conducir a la selección de subconjuntos que tienen paneles de hasta 15 genes o 12 genes o tan pequeños como de 6, 5, 4, 3 genes.

Se prevé que cualquier estado biológico individual pueda describirse por un panel de firma que tenga un número pequeño de constituyentes sumamente informativos que proporcionen un perfil calibrado de firma (también denominado en lo sucesivo una huella digital). La presencia de loci sumamente informativos se demuestra en varias de las figuras adjuntas. Por ejemplo, la figura 11(a) Il-2, Il-4 y Il-5 parece ser sumamente informativa. Los constituyentes sumamente informativos en la figura 21 incluyen las interleucinas. El panel de firma puede proporcionar un perfil de firma o huella digital que es suficientemente sólido para servir de un patrón en la descripción de un estado biológico particular o un efecto de un agente particular en un estado biológico.

Para fines de ilustración de un panel de firma se ha proporcionado que los constituyentes de un panel para medir la inflamación son informativos respecto a un estado biológico particular. Por ejemplo, se ha usado un panel para inflamación que tiene 6 constituyentes Il-1a, Il-6, Il-8, Il-18, GMCSF e IFN-g en la figura 18(a)-(e) para determinar la respuesta de 5 sujetos a concentraciones variables de fármacos. Este grupo de constituyentes es un subconjunto de un panel mayor de inflamación referido a loci de genes tal como se muestra en la figura 19a y la figura 19b en las que el panel inflamatorio incluye Il-a, Il-b, Il-2, Il-3, Il-4, Il-6, Il-7, Il-8, Il-10, Il-12p40, Il-15, Il-15, Il-18, GM-CSF, Ifn-gamma, TGF-b, cox-2, ICE, MMP-9, ICAM, TNF-a y TNF-b. El subconjunto de constituyentes se seleccionó basándose en la información buscada referente al estado biológico.

Las realizaciones de la invención proporcionan ejemplos de al menos 4 paneles diferentes que pueden usarse por separado o juntos. Estos paneles son un panel inflamatorio (TNF-a, Il-1b, ICAM, Il-8, Il-10, Il-12p40, ICE, cox-2, cox-1 y mmp-3), un panel de crecimiento y diferenciación celular (c-fos, c-jun y STAT3), un panel de toxicidad (SOD-1, TACE, GR, HSP70, GST, c-fos, c-jun, INOS) y un panel de metabolismo hepático (INOS, cyp-a y u-pa). Otros paneles incluyen paneles de respuesta de la piel o respuesta de cáncer de próstata o endotelial/cardiovascular o paneles de crecimiento o diferenciación celular o metabolismo hepático. Aunque se proporcionan como ejemplos, los paneles anteriores no pretenden ser limitantes.

#### 50 *Expresión génica*

Para medir la cantidad de un ARN particular en una muestra, el ARN transcrita de una muestra se extrae y se cuantifica respecto a un constituyente de un panel. El ARN se extrae de una muestra tal como un tejido, fluido corporal o medio de cultivo en el que puede estar creciendo una población de un sujeto. Por ejemplo, las células pueden lisiarse y el ARN eluirse en una disolución adecuada en la que realizarse una reacción de ADNs. Entonces, la primera síntesis de cadenas puede realizarse usando una transcriptasa inversa. Luego puede realizarse la amplificación génica, más específicamente ensayos de PCR cuantitativa, y calibrarse el gen de tamaño de interés contra un marcador tal como ARNr 18S (Hirayama y col., Blood 92, 1998:46-52). Las muestras se miden en múltiples duplicados, por ejemplo 4 replicaciones. La cuantificación relativa del ARNm se determina por la diferencia en ciclos umbral entre el marcador de tamaño y el gen de interés. En una realización de la invención se realiza PCR cuantitativa usando amplificación, agentes indicadores e instrumentos tales como los suministrados comercialmente por PE Biosystems (Foster City, CA). Dada una eficiencia de amplificación definida de transcritos diana, el punto (por ejemplo, número de ciclos) cuya señal del molde diana amplificado puede detectarse puede relacionarse directamente con la cantidad de transcripto de mensaje específico en la muestra medida. Similarmente pueden usarse otras señales cuantificables, tales como fluorescencia, actividad enzimática, desintegraciones por minuto, absorbancia, etc., cuando se correlacionan con una concentración conocida de moldes diana (por ejemplo, una curva patrón de referencia) o se normalizan a un patrón con variabilidad limitada, para cuantificar el número de moldes diana en una muestra desconocida.

5 Aunque no se limita a procedimientos de amplificación, las técnicas de expresión génica cuantitativa pueden utilizar amplificación del transcripto diana. La amplificación del molde diana puede llevarse a cabo mediante estrategias de amplificación génica isoterma o mediante amplificación génica mediante ciclado térmico tal como PCR. Se desea obtener una correlación definible y reproducible entre la diana amplificada o indicador y la concentración de moldes de partida.

10 Se prevé que las técnicas en la materia que usan, por ejemplo, microfluídica y marcadores sumamente sensibles, permitirán que la cuantificación de ARN se produzca directamente a partir de una única célula o célula lisada. La cantidad de transcripto medida para cualquier locus particular es un punto de datos o miembro del primer conjunto de datos de perfil para un panel particular.

15 Según realizaciones de la invención, un primer conjunto de datos de perfil se deriva de la muestra, incluyendo el primer conjunto de datos de perfil una pluralidad de miembros, siendo cada miembro una medida cuantitativa de la cantidad de un ARN transcripto de un locus de gen, siendo el locus de gen un constituyente en un panel de constituyentes. Puede obtenerse un primer conjunto de datos de perfil de una medida cuantitativa de la cantidad de un ARN o proteína distinta correspondiente a un locus de gen. Las figuras proporcionadas en este documento se refieren a ARN. Sin embargo, el procedimiento podría aplicarse usando proteínas en el que están disponibles técnicas cuantitativas sensibles para medir la cantidad de una proteína distinta en una célula.

20 *Conjuntos de datos de perfil de nivel inicial*

25 Los análisis de muestras de individuos únicos y de grandes grupos de individuos proporcionan un archivo de conjuntos de datos de perfil que se refieren a un panel particular o serie de paneles. Estos conjuntos de datos de perfil pueden almacenarse como registros en un archivo para uso como conjuntos de datos de perfil de nivel inicial. Como sugiere el término "nivel inicial", los conjuntos de datos de perfil de nivel inicial almacenados sirven de comparadores para proporcionar un conjunto de datos de perfil calibrados que es informativo sobre un estado biológico o agente. Se anticipa que muchos conjuntos de datos de perfil de nivel inicial se almacenarán en archivos y se clasificarán en varios 30 modos de referencias cruzadas. Una forma de clasificación puede basarse en las características de los paneles de los que se derivan los conjuntos de datos. Otra forma de clasificación puede ser el uso de un estado biológico particular. El concepto de estado biológico engloba cualquier estado en el que puede estar en un momento dado una célula o población de células. Este estado puede reflejar geografía de muestras, sexo de sujetos o cualquier otro discriminador. Algunos de los discriminadores pueden solaparse. A los archivos también puede accederse por registros asociados con un único sujeto o ensayo clínico particular. La clasificación de conjuntos de datos de perfil de nivel inicial puede anotarse adicionalmente con información médica sobre un sujeto particular, un estado médico, un agente particular, 35 etc.

40 La elección de un conjunto de datos de perfil de nivel inicial para crear un conjunto de datos de perfil calibrados está relacionada con el estado biológico que va a evaluarse, monitorizarse o predecirse, además de con el uso previsto del panel calibrado, por ejemplo, para monitorizar el desarrollo de fármacos, control de calidad u otros usos. Puede desearse acceder a conjuntos de datos de perfil de nivel inicial del mismo sujeto para el que se obtiene un primer 45 conjunto de datos de perfil o de diferente sujeto a tiempos variables, exposiciones a estímulos, fármacos o compuestos complejos; o puede derivarse de poblaciones similares o diferentes.

50 El conjunto de datos de perfil puede producirse del mismo sujeto para el que se obtiene el primer conjunto de datos, en el que la muestra se toma a un tiempo distinto o similar, un sitio diferente o similar o en un estado fisiológico diferente o similar. Por ejemplo, la figura 5 proporciona un protocolo en el que la muestra se toma antes de la estimulación o después de la estimulación. El conjunto de datos de perfil obtenido de la muestra sin estimular puede servir de un conjunto de datos de perfil de nivel inicial para la muestra tomada después de la estimulación. El conjunto de datos de nivel inicial también puede derivarse de un archivo que contiene conjuntos de datos de perfil de una población de sujetos que tiene alguna característica definitoria o estado biológico. El conjunto de datos de perfil de nivel inicial también puede corresponderse con alguna propiedad *ex vivo* o *in vitro* asociada con un cultivo celular *in vitro*. Entonces, los conjuntos de datos de perfil calibrados resultantes pueden almacenarse como un registro en una base de datos o archivo (figura 6) junto con o separados de la base de datos de perfil de nivel inicial y opcionalmente el primer 55 conjunto de datos de perfil, aunque el primer conjunto de datos de perfil se incorporaría normalmente en un primer conjunto de datos de perfil de nivel inicial bajo criterios de clasificación adecuados.

60 Los conjuntos de datos de perfil de nivel inicial seleccionados también pueden usarse como un patrón por el que juzgar los lotes de fabricación en términos de eficacia, toxicidad, etc. Si se está midiendo el efecto de un agente terapéutico, el conjunto de datos de nivel inicial puede corresponderse con perfiles de expresión génica tomados antes de la administración del agente. Si se está determinando el control de calidad para un producto recientemente fabricado, el conjunto de datos de nivel inicial puede corresponderse con una prueba de oro para ese producto. Sin embargo, puede emplearse cualquier técnica de normalización adecuada. Por ejemplo, un conjunto de datos de perfil de nivel inicial medio se obtiene de material auténtico de un nutracéutico herbal de crecimiento natural y se compara con el tiempo y con diferentes lotes con el fin de demostrar consistencia, o falta de consistencia, en lotes de compuestos 65 preparados para la puesta en el mercado.

*Datos calibrados*

Un conjunto de datos de perfil calibrados puede describirse como una función de un miembro de un primer conjunto de datos de perfil y un miembro correspondiente de un conjunto de datos de perfil de nivel inicial para un locus de gen

5 dado en un panel. Por ejemplo, los conjuntos de datos de perfil calibrados pueden derivarse calculando una relación de la cantidad de ARN transcrita para un constituyente de panel en una muestra de células en un medioambiente que incluye intervención tal como un tratamiento terapéutico o en un tiempo particular (primer conjunto de datos de perfil) respecto a la cantidad de ARN transcrita para el mismo constituyente de panel en una célula que se diferencia de algún modo de la muestra (conjunto de datos de perfil de nivel inicial) (figuras 5 y 6). Se ha encontrado que los 10 conjuntos de datos de perfil calibrados pueden reproducirse en muestras que se prueban repetidamente (figura 17). También se ha encontrado que conjuntos de datos de perfil calibrados obtenidos cuando las muestras de un sujeto se exponen *ex vivo* a un compuesto pueden compararse con datos de perfil calibrados de una muestra que se ha expuesto a una muestra *in vivo* (figura 14 y Figura 16(a), (b)). También se ha encontrado que una línea celular indicadora tratada con un agente puede proporcionar conjuntos de datos de perfil calibrados comparables con los obtenidos de 15 poblaciones *in vivo* o *ex vivo* de células (figura 15). Además, se ha encontrado que administrar una muestra de un sujeto en células indicadoras puede proporcionar conjuntos de datos de perfil calibrados informativos respecto al estado biológico del sujeto, incluyendo la salud, estados de enfermedad, intervenciones terapéuticas, envejecimiento o exposición a estímulos o toxinas medioambientales del sujeto (figura 25).

20 Un uso preferido de un conjunto de datos de perfil calibrados es evaluar un estado biológico de un sujeto. Esto puede ser para fines de diagnóstico o pronóstico de un trastorno clínico. Es deseable obtener un conjunto de datos calibrados que describa un estado de salud o alternativamente un estado de edad o masa corporal o cualquier condición o estado en la que un sujeto individual encuentre que pueda estar. Por ejemplo, el estado biológico puede relacionarse con actividad física, preparación o ejercicio, estado mental, factor medioambiental tal como medicación, 25 alimentación o geografía o exposición a radiación o contaminación medioambiental o agente infeccioso, toxina biológica o medioambiental. Si se está evaluando la salud o por el contrario un trastorno clínico, los conjuntos de datos de perfil calibrados pueden usarse para monitorizar el cambio en el estado de salud mediante comparación periódica o regular de perfiles; el trastorno puede ser un proceso patológico complejo que posiblemente implica múltiples genes incluyendo inflamación, enfermedad autoinmune, enfermedad degenerativa, alergia, enfermedad vascular, isquemia, 30 enfermedad del desarrollo, estados hormonales y enfermedades infecciosas. El trastorno clínico puede incluir además artritis, asma, esclerosis múltiple y cambios perimenopáusicos. El estado biológico puede afectar un sistema de un sujeto que incluye un sistema respiratorio, vascular, nervioso, metabólico, urinario, reproductor, estructural e inmunitario u otro estado metabólico. Los ejemplos anteriores de un estado biológico se dan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes.

35 Similarmente, los conjuntos de datos de perfil calibrados pueden usarse para medir, monitorizar o predecir la respuesta del huésped a un agente infeccioso para fines de identificar el agente infeccioso, evaluar la duración de la infección, el grado de exposición o tomar decisiones terapéuticas.

40 La evaluación de la actividad de un agente puede requerir una serie de perfiles calibrados. En este documento se muestra que los conjuntos de datos de perfil calibrados pueden usarse para describir la actividad biológica de un agente que puede ser un único compuesto o un compuesto complejo tal como un nutracéutico o herbal. El agente puede ensayarse usando células indicadoras, poblaciones de células *ex vivo* o mediante administración *in vivo*. Estos ensayos pueden basarse en una serie de paneles de firmas o paneles ampliados para diferentes estados biológicos. 45 Entonces, los perfiles calibrados resultantes pueden usarse para deducir actividad *in vivo* probable del estudio *in vitro*. La toxicidad y mecanismos de acción también puede deducirse de conjuntos de datos de perfil de calibrado. Por ejemplo, se cree que la equinácea herbal tiene tanto propiedades inmunoestimulantes como antiinflamatorias, aunque ninguna se ha medida sistemáticamente. Se ha proporcionado una aproximación sistemática para investigar las actividades biológicas de estas y otras hierbas. Se investigaron las supuestas propiedades inmunoestimulantes de 50 las hierbas comparando el efecto de tratar la línea celular indicadora THP-1 o células de sangre periférica con el agente respecto a células sin tratar. Células sin tratar incluyen células sin tratar estimuladas con LPS. Las células sin tratar se usaron como un conjunto de datos de perfil de nivel inicial para medir la diferencia en la expresión génica entre un conjunto de datos de perfil de nivel inicial y el tratamiento experimental con el compuesto. Los conjuntos de datos de perfil de nivel inicial incluyeron una única muestra o un valor medio de una serie de experimentos. Entonces, los conjuntos de datos de perfil calibrados resultantes podrían compararse con un archivo de 55 conjuntos de datos de perfil calibrados para una hierba particular o/y archivos asociados con diferentes agentes o estados.

60 De la información obtenida sobre un agente no descrito previamente puede derivarse opcionalmente un panel de firma junto con un perfil de firma que sirve de una prueba de oro para probar otros lotes del mismo agente.

*Cálculo de conjuntos de datos de perfil calibrados y herramientas computacionales*

65 La función que se refiere al nivel inicial y conjuntos de datos de perfil es en una realización preferida una relación expresada como un logaritmo. El conjunto de datos de perfil calibrados puede expresarse en una hoja de cálculo o representarse gráficamente, por ejemplo, en un diagrama de barras o en forma de tabla, pero también puede expresarse en una representación tridimensional. Preferentemente, el constituyente se desglosa en el eje x y la escala logarítmica está en el eje y. Los miembros de un conjunto de datos calibrados pueden expresarse como un valor positivo que

representa una mejora relativa de la expresión génica o como un valor negativo que representa una reducción relativa en la expresión génica respecto al nivel inicial.

- Cada miembro del conjunto de datos de perfil calibrados debe poder reproducirse dentro de un intervalo respecto a muestras similares tomadas del sujeto en condiciones similares. Por ejemplo, los conjuntos de datos de perfil calibrados deben poder reproducirse dentro de un orden de magnitud respecto a muestras similares tomadas del sujeto en condiciones similares. Más particularmente, los miembros deben poder reproducirse dentro del 50%, más particularmente reproducirse dentro del 20%. Cada miembro del conjunto de datos de perfil calibrados tiene una importancia biológica si tiene un valor que se diferencia en más de una cantidad D, en la que  $D = F(1,1)-F(,9)$  y F es una segunda función.

Se examina el modelo creciente, decreciente y sin cambio en la expresión génica de la pluralidad de loci de genes en el panel que se usa para preparar un conjunto de perfil calibrado que es informativo respecto a un estado biológico, la eficacia biológica de las condiciones de tratamiento con agente o para comparar con poblaciones y que puede usarse para identificar probables candidatos para un ensayo de fármacos, usado en combinación con otros indicadores clínicos que van a ser diagnósticos o pronósticos respecto a un estado biológico o puede usarse para guiar el desarrollo de un producto farmacéutico o nutracéutico a lo largo de la fabricación, ensayo y comercialización.

Los datos numéricos obtenidos de la expresión génica cuantitativa y los datos numéricos de la expresión génica calibrada respecto a un conjunto de datos de perfil de nivel inicial pueden almacenarse en bases de datos o medios de almacenamiento digital y pueden recuperarse para fines que incluyen la gestión de la asistencia médica del paciente o para realizar ensayos clínicos o para caracterizar un fármaco. Los datos pueden transferirse en redes, por ejemplo, mediante internet ("world wide web"), e-mail o sitio de acceso a internet o mediante copia impresa de manera que se recojan y reúnan de sitios geográficos remotos (figura 8).

En una realización preferida, un registro descriptivo se almacena en una única o múltiples bases de datos en las que los datos almacenados incluyen los datos brutos de expresión génica (primer conjunto de datos de perfil) antes de la transformación mediante uso de un conjunto de datos de perfil de nivel inicial, además de un registro del conjunto de datos de perfil de nivel inicial usado para generar el conjunto de datos de perfil calibrados que incluye, por ejemplo, anotaciones referentes a si el conjunto de datos de perfil de nivel inicial se deriva de un panel de firma particular y cualquier otra anotación que facilite la interpretación y uso de los datos.

Debido a que los datos están en un formato universal, la manipulación de datos puede hacerse fácilmente con un ordenador. Los datos se organizan para proporcionar una salida opcionalmente correspondiente a una representación gráfica de un conjunto de datos calibrados. Por ejemplo, una muestra distinta derivada de un sujeto que es al menos una de ARN o proteína puede denominarse  $P_i$ . El primer conjunto de datos de perfil está constituido por  $M_j$ , en el que  $M_j$  es una medida cuantitativa de un constituyente de ARN o proteína distinto. El registro  $R_i$  es una relación de  $M$  y  $P$  y puede anotarse con datos adicionales en el sujeto refiriéndose a, por ejemplo, edad, alimentación, origen étnico, sexo, localización geográfica, trastorno médico, trastorno mental, medicación, actividad física, masa corporal y exposición medioambiental. Además, la manipulación de datos puede incluir adicionalmente el acceder a los datos de una segunda base de datos de estados que puede contener datos médicos adicionales actualmente no válidos con los conjuntos de datos de perfil calibrados. En este contexto, el acceso a datos puede ser mediante una red de ordenadores.

El almacenamiento de datos en un ordenador anteriormente descrito puede proporcionar la información en una forma a la que puede acceder un usuario. Por consiguiente, el usuario puede cargar la información en un segundo sitio de acceso que incluye descargar la información. Sin embargo, el acceso puede restringirse a usuarios que tienen una contraseña u otro dispositivo de seguridad de manera que se protejan los registros médicos contenidos en su interior. Una característica de esta realización de la invención es la capacidad de un usuario para añadir registros nuevos o anotados al conjunto de datos de manera que los registros llegan a ser parte de la información biológica.

La representación gráfica de conjuntos de datos de perfil calibrados referentes a un producto tal como un fármaco proporciona una oportunidad para estandarizar un producto por medio del perfil calibrado, más particularmente un perfil de firma. El perfil puede usarse como una característica con la que promocionar el fármaco.

Las diversas realizaciones de la invención también pueden implementarse como un producto de programa informático para uso con un sistema informático. El producto puede incluir código de programa para derivar un primer conjunto de datos de perfil y para producir perfiles calibrados. Tal implementación puede incluir una serie de instrucciones informáticas fijadas o en un medio tangible, tal como un medio legible por ordenador (por ejemplo, un disquete, CD-ROM, ROM o disco fijo), o que pueden transmitirse a un sistema informático mediante un módem u otro dispositivo de interfaz, tal como un adaptador de comunicación conectado a una red por un medio. El medio puede ser o un medio tangible (por ejemplo, líneas de comunicación ópticas o analógicas) o un medio implementado con técnicas inalámbricas (por ejemplo, microondas, infrarrojos u otras técnicas de transmisión). La serie de instrucciones informáticas incorpora preferentemente todo o parte de la funcionalidad previamente descrita en este documento respecto al sistema. Aquellos expertos en la materia deben apreciar que tales instrucciones informáticas pueden escribirse en varios lenguajes de programación para uso con muchas arquitecturas de ordenadores o sistemas operativos. Además, tales instrucciones pueden almacenarse en cualquier dispositivo de memoria, tales como dispositivos semiconductores, magnéticos, ópticos u otros dispositivos de memoria, y pueden transmitirse usando cualquier tecnología de comunicación tales como tecnologías ópticas, infrarrojos, microondas u otra tecnología de transmisión. Se espera

que un producto de programa informático tal pueda distribuirse como un medio extraíble con documentación impresa o electrónica adjunta (por ejemplo, software envuelto en plástico retráctil) previamente cargado con un sistema informático (por ejemplo, en ROM del sistema o disco fijo) o distribuido de un servidor o tablón de anuncios electrónico por la red (por ejemplo, internet o world wide web). Además, se proporciona adicionalmente un sistema informático que incluye módulos derivados para derivar un primer conjunto de datos y un conjunto de datos de perfil de calibrado.

#### 5 *Ensayos clínicos*

10 El uso de conjuntos de datos de perfil calibrados para realizar ensayos clínicos se ilustra en la figura 10 usando los procedimientos anteriormente descritos y procedimientos para realizar un ensayo clínico o gestionar los cuidados del paciente. Además, la estandarización entre laboratorios puede conseguirse usando una línea celular indicadora particular tal como THP-1, que se estimula mediante un estimulador conocido tal como lipopolisacárido, de manera que el perfil resultante sirva de medida de que el laboratorio está realizando correctamente el protocolo.

15 Ejemplos de cómo pueden usarse las realizaciones de la invención para aumentar los ensayos clínicos incluyen proporcionar nuevos procedimientos para la selección de pacientes. Los ensayos clínicos en los que se incluyen o excluyen sujetos candidatos según un perfil calibrado óptimo predeterminado para un estado biológico dado pueden dar como resultado una monitorización más precisa de la que de otro modo sería posible. También puede dar como resultado una mayor eficacia en el diseño de ensayos clínicos debido a que pueden eliminarse pacientes inadecuados 20 que tienen, por ejemplo, factores o estados de complicación. Los datos de perfil calibrados también mejorarán la “señal a ruido” eliminando no respondedores de estudios de placebo de doble ciego. La estructura básica de un diseño de ensayos clínicos usando perfiles de expresión génica podría seguir cualquiera de varios formatos. Estos incluyen probar el fluido corporal de un paciente candidato en el ensayo *ex vivo* contra un nuevo agente terapéutico y analizar los perfiles calibrados respecto a una muestra tratada con agente y tratada con placebo usando un panel predeterminado 25 y evaluar si sería posible que el paciente candidato respondiera sin efectos adversos a la composición que está probándose. En indicaciones seleccionadas pueden desearse datos de perfil obtenidos de cultivos celulares *in vitro* o cultivos de órganos en los que la célula se origina de un sujeto diana o de otro sujeto o de una línea celular establecida, o de una muestra de células eliminada del sujeto diana en el que las muestras de células pueden obtenerse de cualquier fluido corporal que incluye sangre, orina, semen, líquido amniótico o una muestra de fluido cerebroespinal, o de un 30 raspado de membranas mucosas tales como de la cavidad bucal, el ojo, nariz, vagina o por medio de una biopsia que incluye tejido epitelial, hepático, de la médula esternal, testicular o de tejido tumoral eliminado quirúrgicamente de un tumor en cualquier localización. Las fuentes de muestras anteriormente mencionadas pueden aplicarse a cualquier uso médico en el que se deseen conjuntos de datos de perfil calibrados.

35 Los estudios de dosificación y toxicidad *in vitro* usando conjuntos de datos de perfil calibrados obtenidos de líneas celulares indicadoras o muestras del paciente probado *ex vivo* pueden proporcionar información útil antes de iniciar el ensayo clínico y pueden reducir significativamente gastos y tiempo de un ensayo clínico, a la vez que aumenta la probabilidad de identificar la presencia de efecto beneficioso. En particular, la dosis puede optimizarse en una base individualizada para maximizar el impacto en resultados terapéuticos. Por ejemplo, la figura 12 muestra cómo células 40 sanguíneas *ex vivo* responden al efecto estimulante de LPS y el posterior tratamiento con un fármaco antiinflamatorio (metotrexato, meclofenamato o metilprednisolona). Los datos muestran cómo el efecto de metotrexato y meclofenamato genera conjuntos de datos de perfil calibrados similares en los que el nivel inicial es sangre tratada con LPS. A diferencia, la metilprednisolona tiene un efecto sustancialmente diferente de los otros dos compuestos. Puede realizarse un tipo de análisis similar con mezclas complejas como se ilustra en la figura 21, en la que se comparan los perfiles 45 calibrados obtenidos cuando equinácea, árnica y ginseng de Siberia se aplican a sangre *ex vivo* estimulada con LPS. En este ejemplo, los tres agentes parecen actuar de manera diferente entre sí respecto a una muestra de un único sujeto. Pueden usarse análisis similares para comparar compuestos con dianas o actividades o modelos metabólicos desconocidos con compuestos, complejos o simples, con perfiles conocidos o predeterminados.

50 Los métodos y procedimientos anteriores pueden utilizarse en el diseño y ejecución de ensayos clínicos o como una herramienta complementaria. Además, los métodos y procedimientos anteriores pueden usarse para monitorizar la salud del paciente, además de la receptibilidad del paciente a un agente antes, durante y después del ensayo clínico. Esto incluye monitorizar si múltiples agentes interfieren entre sí, actúan sinérgicamente o aditivamente o son tóxicos o neutros entre sí. Este tipo de información es muy importante ya que los individuos toman un número creciente de medicaciones.

60 Similarmente, los métodos y procedimientos descritos anteriormente pueden usarse para gestionar el cuidado del paciente para un individuo o una población. Tales métodos y procedimientos también pueden usarse para desarrollar una red de investigación regional o global que usa conjuntos de datos de perfil calibrados y las bases de datos resultantes para realizar investigación o ensayos.

Tanto los conjuntos de datos de perfil de calibrado en forma gráfica como las bases de datos asociadas junto con información extraída de ambos son artículos que pueden comercializarse juntos o por separado para una variedad de fines. Por ejemplo, las representaciones gráficas de conjuntos de datos de perfil de calibrado pueden proporcionar una 65 descripción de un producto respecto a su actividad que puede usarse para promocionar el producto. Alternativamente, la forma gráfica de los conjuntos de datos de perfil calibrados y el acceso a bases de datos de perfil de nivel inicial proporcionan un medio para fabricantes para probar lotes diferenciados de producto frente a una prueba de oro.

- Los datos pueden usarse estratégicamente para diseñar ensayos clínicos. También pueden ser útiles para médicos que ejercen en sitios remotos para ofrecer atención médica personalizada a un paciente. Por consiguiente, el médico puede establecer bases de datos personalizadas para conjuntos de datos de perfil calibrados antes de y después del tratamiento de un estado particular. Podrían añadirse nuevos datos sobre el sujeto a la base de datos personalizada en 5 cada visita al doctor. Los datos podrían generarse en sitios remotos mediante uso de kits que permiten a un médico obtener un primer conjunto de datos de perfil de una muestra de un paciente. Para usuarios remotos que acceden al sitio se prevé que sería necesario el acceso protegido a la red global que contiene archivos de conjuntos de datos de perfil de nivel inicial y conjuntos de datos de perfil calibrados, clasificados por criterios particulares y que representan 10 datos poblaciones mayores que un único individuo. El acceso a la base de datos global puede estar protegido con contraseña, protegiéndose así la base de datos de registros corruptos y salvaguardando los datos médicos personales. La forma gráfica proporcionada por los conjuntos de datos calibrados puede usarse para crear catálogos de compuestos en una farmacopea completa con efectos tóxicos que pueden producirse para individuos particulares, además de otros tipos de interacciones de fármacos.
- 15 El acceso a la base de datos global puede incluir la opción de cargar datos seleccionados en un segundo sitio de acceso. Este procedimiento incluiría descargar la información a cualquier sitio que desee el usuario e incluiría asegurar copias impresas de información. Se desea controlar cómo y qué datos se descargan o copian para mantener la integridad de la base de datos. Se prevé que aunque una red global de datos clínicos sería una fuente de información, 20 tendría utilidad realizar investigación que pudiera incluir estudios epidemiológicos y estudios referentes al mecanismo de acción de un agente y estudios referentes a la naturaleza de variabilidad interpersonal como se determina por conjuntos de datos de perfil calibrados.

## Ejemplos de usos médicos

- 25 (a) Detección precoz de enfermedades infecciosas. Los marcadores o marcadores sustitutos de ratones pueden obtenerse para medir la expresión génica en seres humanos que indica respuesta precoz o inmediata a infección, por ejemplo, a un virus tal como virus de la hepatitis, o a una bacteria tal como *Mycobacterium tuberculosis* (el agente etiológico Gram-positivo de tuberculosis) (véase la figura 4). Se identifican genes candidatos y los cambios en la expresión de esos genes en presencia de un desafío proporcionan un conjunto de marcadores. El conjunto de 30 marcadores puede combinar marcadores codificados por el genoma del sujeto y marcadores más distintos codificados por el genoma del agente infeccioso. Por ejemplo, los cambios en la expresión de un gen precoz inmediato de un virus, por ejemplo un gen que codifica una enzima de replicación viral, y un gen huésped tal como el gen para cualquiera o todos de IL-2, IL-4 y IL-5, pueden comprender marcadores o marcadores sustitutos para un estado médico que puede detectar esa condición antes de la aparición de síntomas médicos. Este procedimiento permite la detección más precoz 35 de una infección de lo que es posible usando técnicas diagnósticas actuales.
- (b) Perfiles de toxicidad y perfiles de mecanismos obtenidos de un ensayo *in vitro* y ensayos *in vivo*. La toxicidad e información de mecanismos que se producen de la administración de un compuesto a una población de células puede monitorizarse usando conjuntos de datos de perfil calibrados. Lo siguiente es un ejemplo de un protocolo experimental 40 para obtener esta información. En primer lugar se establece un grupo experimental: (1) células de control conservadas sin agente terapéutico y sin estímulo; (2) células tratadas con agente terapéutico pero sin estímulo; (3) células sin agente terapéutico pero con estímulo, (4) muestra con agente terapéutico y con estímulo. La población de células puede 45 seleccionarse de cultivos celulares primarios preparados en placas de cultivo usando procedimientos bien establecidos en la materia; o preparación de células diferenciadas adultas de sangre completa o monolitos aislados del organismo diana, que en este ejemplo es ratón.

- Las células se estimulan de manera que presentan un estado fisiológico elegido como diana mediante tratamiento previo con LPS purificado de una bacteria Gram-negativa (una variedad de preparaciones de LPS de bacteria patógena, por ejemplo, de *Salmonella typhimurium* y de *Escherichia coli* O1157:H7, está disponible de Sigma, St. Louis, MO). 50 El agente terapéutico administrado a las muestras de células en este ejemplo es un inhibidor de una enzima conocida por ser clave en la etiología de enfermedades, concretamente un inhibidor de una proteasa o una polimerasa de ácido nucleico. Tras el tratamiento mediante adición del agente terapéutico y posterior incubación durante de cuatro a seis horas, las muestras de las células se recogen y se analizan para expresión génica. El ácido nucleico, específicamente ARN, puede prepararse de la muestra mediante procedimientos conocidos para un experto en la materia (véase, 55 por ejemplo, el reactivo Lyse-N-Go™, Pierce Chem. Co., Rockford, IL). Las muestras se analizan por QPCR según un procedimiento de replicación cuantitativa, (procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (QPCR)) (véase, por ejemplo, Gibson, U. 1996 Genome Res.6:995-1001, y bibliografía citada en el mismo). El ARN total se evaluó usando cebadores universales. La toxicidad del agente para células puede medirse en células sin tratar mediante captación de tinción esencial, velocidad de síntesis de ADN (autorradiografía de ácido nucleico marcado en 60 comparación con células teñidas), tinción mediante ojos específicos de ADN (Hoechst), etc. Los perfiles de mecanismos pueden determinarse mediante análisis de las identidades de genes regulados al alza y a la baja *de novo*. Además, en presencia de un agente terapéutico no se expresan algunos genes, que indica eficacia potencial del agente terapéutico en la supresión de los efectos de estimulación por los LPS. Por ejemplo, en la figura 21, los niveles de ICE que 65 se estimulan algo en presencia de LPS + equinácea son sustancialmente bajos por LPS + árnica respecto a las células estimuladas con LPS en ausencia de agente. Los niveles de HSP 70 que son bajos en presencia de LPS + equinácea se estimulan sustancialmente en presencia de LPS + árnica, y LPS + ginseng de Siberia respecto a células estimuladas con LPS en ausencia de la adición de un agente. Los niveles de IL-12p40 que aumentan ligeramente en presencia de LPS + equinácea son sustancialmente bajos en presencia de LPS + árnica y LPS + ginseng de Siberia respecto a la

estimulación con LPS. A diferencia de los nutracéuticos que se usan anteriormente, la figura 16 muestra una reducción mucho más mejorada de la expresión génica en sangre completa para IL-1a, IL-1b, IL-7, IL-10, IL-IL-15, IFN-g, TGF-b, TNF-b cox-2 y ICAM en presencia de prednisolona + LPS cuando se compara con árnica + LPS o nada + LPS.

- 5 (c) Cuantificación de expresión génica en una célula sanguínea para predecir la toxicidad en otro tejido u órgano.

Los leucocitos pueden obtenerse de una muestra de sangre de un sujeto para el fin de evaluar el aspecto de un estado patológico en otro órgano, por ejemplo el hígado. Se obtiene un conjunto de datos de perfil de genes expresado en los leucocitos, por ejemplo, genes que codifican un conjunto de linfocinas y citocinas. El conjunto de datos se 10 compara con el de la base de datos para examinar correlaciones, por ejemplo, con otros sujetos, y con el sujeto antes de la administración de un agente terapéutico.

Mediante este procedimiento puede sacarse una correlación entre, por ejemplo, la administración de acetaminofeno (Tylenol) y la sensibilidad a este agente terapéutico y se manifiesta por lesión hepática. Una predicción precoz 15 de la sensibilidad del agente terapéutico, detectada antes de la aparición de la lesión actual al hígado, puede estar clínicamente disponible de manera que el sujeto no reciba más administración de acetaminofeno. El éxito de la base de datos es la capacidad para detectar una correlación o correlaciones antes de la aparición de evaluaciones médicas tradicionales tales como aumento en el nivel de bilirrubina u otra indicación de patología hepática.

- 20 (d) Perfiles calibrados de células sanguíneas para pronóstico de gravedad y predicción de reacciones adversas en el tratamiento de una enfermedad autoinmune. La probabilidad y sincronización de aparición de síntomas de una enfermedad autoinmune, por ejemplo, artritis reumatoide, puede monitorizarse mediante el aspecto de la expresión de marcadores o marcadores sustitutos como se determina por los procedimientos de perfil de expresión génica de 25 marcadores o marcadores sustitutos y comparación con una base de datos de perfiles como se describe anteriormente.

25 Por tanto, puede obtenerse una indicación de aparición inminente y puede tomarse una gestión avanzada mediante la utilización de medidas preventivas para prevenir la aparición. Además, el usuario puede elegir un conjunto de agentes terapéuticos potenciales y evaluar para un agente dado la probabilidad de que un sujeto presentará una reacción adversa si se le da un tratamiento de curso completo, antes del curso completo. Por ejemplo, usando realizaciones de la 30 invención pueden administrarse una dosis única del agente metotrexato a un sujeto que tiene artritis y en necesidad de un agente terapéutico. Si el conjunto de datos de perfil de expresión génica del sujeto en respuesta a una dosis única de metotrexato se corresponde con conjuntos de datos de sujetos que tienen reacciones adversas a este agente, entonces se contraindica la administración de un curso completo de metotrexato. Por el contrario, si el conjunto de datos de perfil de expresión génica se correlaciona con el de sujetos que han respondido positivamente a la administración de un curso de tratamiento de metotrexato, entonces este agente terapéutico puede administrarse al sujeto con mucha 35 menor probabilidad de reacción adversa.

## Discusión de las figuras

40 Las figuras 1-4 ilustran alguna de las aplicaciones de conjuntos de datos de perfil calibrados. En la figura 1 se proporcionan tres posibles escenarios. En primer lugar, un agente terapéutico candidato puede probarse para determinar sus perfiles de farmacología y toxicología molecular. La prueba puede incluir obtener conjuntos de datos de perfil calibrados para una serie de paneles seleccionados basándose en qué actividad se predice para el fármaco. La población 45 de células expuesta al agente puede ser el resultado de administración *in vivo* como se representa mediante el ratón o exposición directa *in vitro* en la que las células pueden ser una línea celular indicadora o una muestra *ex vivo* del sujeto.

45 El resultado de la selección es la identificación de fármacos candidatos más eficaces para probar en sujetos humanos.

50 El segundo escenario en la figura 1 es el uso de conjuntos de datos de perfil calibrados para identificar una población clínica adecuada para seleccionar un agente terapéutico potencial. Tanto la demostración de falta de toxicidad como la demostración de eficacia clínica requieren ciertas suposiciones sobre la población clínica. Los conjuntos de datos de perfil calibrados proporcionan un medio para establecer aquellas suposiciones respecto al estado biológico de los individuos seleccionados para los ensayos clínicos.

55 El tercer escenario en la figura 1 es la oportunidad de ejercer medicina individualizada que puede incluir crear un archivo de conjuntos de datos de perfil de calibrado en el individuo en un estado de salud de forma que los cambios pueden identificarse usando paneles de firmas de manera que permitan el pronóstico o diagnóstico de un estado particular. Además, la información almacenada sobre el paciente en forma de conjuntos de datos de perfil calibrados permite seleccionar uno de un grupo de posibles agentes terapéuticos más probable que sea eficaz para el paciente, optimizar la dosificación del fármaco y detectar efectos adversos que puedan producirse por interacciones de fármacos antes de la aparición de síntomas. El resultado del uso de conjuntos de datos de perfil calibrados es proporcionar una 60 gestión de la asistencia médica más eficaz y económica.

65 La aproximación novedosa descrita anteriormente para evaluar un estado biológico de un sujeto puede aplicarse a un ensayo *ex vivo* o *in vitro* para medir el efecto de un agente en un estado biológico como se ilustra en las figuras 2-4. Una muestra del paciente puede medirse directamente *ex vivo* o probarse *ex vivo* contra un agente para predecir un efecto en el paciente. Esto proporciona una ruta rápida y eficaz para determinar qué fármaco elegido de dentro de una única clase de fármacos, que puede usarse todos para tratar un estado particular, puede ser la más eficaz para un sujeto dado. Alternativamente puede probarse un agente en una línea celular indicadora que puede proporcionar una medida cuantitativa de acción terapéutica en una clase de individuos.

La figura 2 ilustra cómo los conjuntos de datos de perfil calibrados pueden ayudar en la selección de un archivo de compuestos candidato para descubrir fármacos candidatos. Empezando con, por ejemplo, 500 fármacos candidatos, éstos pueden probarse en células indicadoras o fluido corporal o tejidos *ex vivo* contra paneles de firmas para toxicología o indicadores metabólicos *in vitro*. La figura ilustra el gran número de compuestos que entran en fases tardías en el 5 procedimiento de desarrollo sólo para ser rechazados finalmente debido a interacciones biológicas adversas. Se espera que la adopción temprana del uso de conjuntos de datos de perfil calibrados identificará más rápidamente candidatos probablemente satisfactorios y así se reducirá el gasto y efectos perjudiciales de la experimentación animal y humana para compuestos que podrían haberse predicho que fallarían.

10 La figura 3 describe múltiples selecciones en las que un compuesto puede administrarse a un animal experimental tal como un ratón o a una línea celular indicadora. La muestra de células *in vivo* o *ex vivo* o indicadoras puede tratarse adicionalmente con un estímulo. Entonces, el resultado de tanto el compuesto como el estímulo podría detectarse usando perfiles de firmas para toxicidad o para mecanismo para comparar el efecto de no fármaco +/- estímulo o +/- fármaco y no estímulo. Tanto los estudios *in vitro* (panel izquierdo) como *in vivo* (panel derecho) pueden usarse para 15 evaluar el efecto de un compuesto (fármaco, nutracéutico, estímulos medioambientales, etc.). El panel a mano derecha también ilustra la realización específica de un “ensayo clínico *in vitro*”, es decir, tratamiento de células obtenidas de un sujeto y tratadas con un compuesto (con o sin un estímulo) *in vitro* (o *ex vivo*) con el fin de predecir el resultado de tratamiento similar del sujeto *in vivo* (véase la fig. 15 para un ejemplo específico). La salida de ambos paneles se 20 describe como perfiles de toxicidad y de mecanismos. Puede usarse cualquier curso experimental para evaluar tanto la toxicidad potencial, por ejemplo, usando la toxicidad, como paneles de metabolismo hepático, y para determinar o confirmar mecanismo de acción probable mediante una selección crítica de un panel(es) de genes que ilustra y diferencia mecanismos moleculares de acción (véase la figura 12 para un ejemplo específico).

25 La figura 4 ilustra un bioensayo en el que las células se extraen del sujeto y se prueban *ex vivo* con la adición de un compuesto y también un desafío o estímulo. El efecto *ex vivo* del estímulo y luego el fármaco en sangre completa tomada de un sujeto humano se muestra en la figura 12, en la que el estímulo es lipopolisacárido (un agente inflamatorio), mientras que el fármaco es cualquiera de metotrexato, meclofenamato o metilprednisolona usando un panel de firma para inflamación. La metilprednisolona, un fármaco comúnmente usado en el tratamiento de exacerbaciones agudas de la EPOC (COPD), además de en la gestión crónica de esta enfermedad, se considera que es un potente 30 agente antiinflamatorio no específico. Sin embargo, como se demuestra en la figura 22, sus efectos en la expresión génica dependen del estímulo. Aunque hay similitudes cualitativas generales entre los efectos en la expresión génica a lo largo de estos tres estímulos, hay diferencias tanto cuantitativas como cualitativas que pueden ser importantes en entender cuando se garantiza la intervención de glucocorticoides.

35 Según realizaciones de la invención se usa una población de células indicadoras para medir expresión génica cuantitativa, el efecto de un agente o una muestra biológica puede influir la elección de qué línea celular indicadora será más informativa. Por ejemplo, una línea celular clonada tal como THP-1 o una población primaria de células (células mononucleares periféricas) pueden proporcionar información que es comparable con la obtenida directamente de una muestra de cuerpo (véase la figura 15). El estado normal de expresión génica puede oscilar de cero a pocos 40 transcritos hasta  $10^5$  o más transcritos.

Similarmente puede evaluarse un agente para su efecto en cualquier población de células, bien *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, administrando el agente y luego determinando un conjunto de datos de perfil de calibrado para esas células en las condiciones seleccionadas. Ejemplos de esta aproximación se proporcionan en las figuras 10-16 y 18. La figura 45 18 proporciona además conjuntos de datos de perfil calibrados para diferentes concentraciones de un único agente mostrando que la transcripción de constituyentes seleccionados varía con la dosis y por tanto la eficacia anticipada respecto al estado biológico.

50 La descripción anterior para determinar un estado biológico se ilustra del siguiente modo. La acción de un producto farmacéutico o nutracéutico se mide respecto a sus propiedades antiinflamatorias. La medición del efecto puede establecerse usando un panel de loci de genes constituyentes, por ejemplo, un panel de inflamación que incluye interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). El efecto antiinflamatorio puede establecerse primero tratando células indicadoras o células de muestras *ex vivo* con un inductor de inflamación conocido (por ejemplo, lipopolisacárido u otros mitógenos) seguido por tratamiento con el agente experimental o estado esperado para suprimir o reducir la expresión de los loci de genes apropiados. Según el conjunto de datos de perfil de nivel inicial, el 55 cambio de delta en expresión génica es para un panel de constituyentes particular. La adición de un potencial agente antiinflamatorio da como resultado un segundo cambio de delta que se superpone a un primer cambio de delta. Esto se ilustra, por ejemplo, en la figura 12. La metilprednisolona tiene un sustancial efecto de regulación a la baja en IL-2 en células sanguíneas estimuladas *ex vivo* con LPS, en la que el conjunto de datos de nivel inicial es células estimuladas con LPS. En este caso hay una delta negativa. A diferencia, IL-2 parece estar regulado al alza en sangre completa no expuesta previamente a LPS, en la que el conjunto de datos de nivel inicial es células sin estimular (figura 16b). Esto concuerda con la observación de que metilprednisolona estimulaba la producción de IL-2.

60 La determinación del estado biológico de un sujeto puede incluir medir y almacenar datos adicionales sobre el sujeto. Por ejemplo, si el sujeto es un paciente humano o mamífero, los indicadores clínicos adicionales pueden determinarse de química sanguínea, ionograma urinario, rayos X, otros ensayos químicos y hallazgos físicos o sociológicos.

La figura 7 ilustra cómo la acumulación de conjuntos de datos de perfil calibrados puede mejorar el poder pronóstico de la base de datos y así aumentar su valor en generar información sobre un estado o agente biológico. La figura indica el uso de la base de datos en términos de su poder pronóstico para, por ejemplo, predecir el curso de una intervención terapéutica, seguir el curso de un sujeto individual comparado con una población, predicción de un mecanismo probable de metabolismo o mecanismo molecular de acción o una base de datos exhaustiva que permita la comparación de un único perfil con una colección de perfiles de precisión calibrados de firmas.

En la figura 8 se proporcionan realizaciones preferidas de cómo puede usarse la base de datos. La figura 8 ilustra una visualización de un conjunto de perfiles de datos de la base de datos fuente. Los accesos a entrar incluyen un nombre, un tipo experimental y si la entrada es una nueva referencia; célula/tejido/especie y si éstas son nuevas; agente terapéutico (compuesto), dosis y parámetros adicionales y si el agente terapéutico es nuevo. Las observaciones se registran según la identidad de un gen (gen nuevo) y una proteína (proteína nueva). Se introducen el estímulo u otro tratamiento, si hay alguno, y la dosis. Se muestran expresión génica (y/o de proteínas), valor de expresión, unidades de expresión, si corresponde, y tiempo de expresión. La figura ilustra específicamente el intervalo de campos de investigación aplicables desde productos naturales complejos hasta ensayos clínicos en seres humanos, enlace a formas tradicionales de medición y evaluación tal como citas bibliográficas, indicadores clínicos y mediciones farmacocinéticas tradicionales. Entonces, el análisis de expertos de los datos de perfil de precisión contenidos en la base de datos puede usarse para guiar el desarrollo y la comercialización del producto, o usarse para mejorar la toma de decisiones clínicas referentes a la salud de un único individuo o población de individuos.

Se anticipa que una forma de registro puede proporcionar información sobre un sujeto o agente respecto a identidad, historial médico que incluye datos farmacéuticos/médicos tradicionales, indicaciones clínicas como se determinan de datos bibliográficos, referencia a tipos adicionales de análisis en la base de datos, etc.

La figura 9 muestra una realización de la presente invención en la que los datos de perfil se evalúan usando datos de una base de datos a la que se accede remotamente por una red. La figura ilustra que se espera que los datos se deriven en una o más localizaciones, comparado con usar una base de datos central e información obtenida usada para afectar, por ejemplo, el curso del tratamiento de un individuo o población. La naturaleza bilateral de 1109 ilustra el procedimiento iterativo por el que la base de datos afecta el curso del tratamiento o desarrollo, y el resultado o respuesta a tal intervención llega a ser parte de nuevo de la base de datos. En una primera localización, como en la figura 5, de una muestra de tejido que se encuentra en el recuadro 1101, se derivan múltiples especies de ARN con arreglo al recuadro 1102, y entonces en el recuadro 1103, los datos de perfil se cuantifican para producir un conjunto de datos de perfil que guarda relación con la muestra de tejido obtenida en el recuadro 1101. Con el fin de evaluar el conjunto de datos de perfil, en el recuadro 1104 se recupera la información de la base de datos 1108, que está localizada en una segunda localización. De hecho, la base de datos puede estar en comunicación con un gran número de localizaciones, cada una de las cuales está generando datos de perfil que deben evaluarse. La recuperación de información de la base de datos se lleva a cabo por una red 1109, que puede incluir internet, de un modo conocido en la técnica. Una vez se ha obtenido la información de la base de datos 1108, la información se usa para evaluar los datos de perfil cuantificados en el recuadro 1105, con el resultado en el recuadro 1106 de que el estado médico del sujeto puede evaluarse. La base de datos 1108 se actualiza en el recuadro 1107 mediante la red 1109 para reflejar los datos de perfil que se han cuantificado en el recuadro 1103. De este modo, la base de datos 1108 puede actualizarse para reflejar los datos de perfil obtenidos de todas las localizaciones, y cada localización tiene el beneficio de los datos obtenidos de todas las localizaciones.

## 45 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### (a) *Uso de sangre completa para evaluación *ex vivo* de un estado biológico afectado por un agente*

Se obtiene sangre humana mediante venopunción y se prepara para ensayo tomando alícuotas de muestras para nivel inicial, sin estímulo y estímulo con suficiente volumen para al menos tres puntos de tiempo. Estímulos típicos incluyen lipopolisacárido (LPS), fitohemaglutinina (PHA) y estafilococos destruidos por calor (HKS) o carragenina y pueden usarse individualmente (normalmente) o en combinación. Las alícuotas de sangre completa heparinizada se mezclan sin estímulo y se mantienen a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 30 minutos. Se añade estímulo a concentraciones variables, se mezcla y se mantiene tapado sin apretar a 37°C durante 30 min. En este momento pueden añadirse compuestos de prueba adicionales y mantenerse durante tiempos variables dependiendo de la farmacocinética esperada del compuesto de prueba. A tiempos definidos, las células se recogen mediante centrifugación, el plasma se elimina y el ARN se extrae mediante diversos medios habituales.

#### (b) *Preparación de ARN para medir expresión génica*

Se purifican ácidos nucleicos, ARN y o ADN de células, tejidos o fluidos de la población de prueba o líneas celulares indicadoras. El ARN se obtiene preferencialmente de la mezcla de ácidos nucleicos usando una variedad de procedimientos habituales (o RNA Isolation Strategies, páginas 55-104, en RNA Methodologies, A laboratory Guide for Isolation and Characterization, 2<sup>a</sup> edición, 1998, Robert E. Farrell, Jr., Ed., Academic Press); en el presente uso usando un sistema de aislamiento de ARN basado en filtros de Ambion (RNAqueous<sup>TM</sup>, kit de aislamiento de ARN total libre de fenol, n° de catálogo 1912, versión 9908; Austin, Texas). Los ARN específicos se amplifican usando

cebadores específicos de mensaje o cebadores aleatorios. Los cebadores específicos se sintetizan de datos obtenidos de bases de datos públicas (por ejemplo, Unigene, Centro Nacional de Información Biotecnológica, Biblioteca Nacional de Medicina, Bethesda, MD), que incluye información de archivos genómicos y de ADNC obtenidas de seres humanos y otros animales. Los cebadores se eligen para amplificarse preferencialmente de ARN específicos obtenidos de las 5 muestras de prueba o indicadoras, véase, por ejemplo, RT-PCR, capítulo 15 en RNA Methodologies, A Laboratory Guide for Isolation and Characterization, 2<sup>a</sup> edición, 1998, Robert E. Farrell, Jr., Ed., Academic Press; o capítulo 22, páginas 143-151, RNA Isolation and Characterization Protocols, Methods in Molecular Biology, volumen 86, 1998, R Rapley y D. L. Manning Eds., Human Press, o 14 en Statistical refinement of primer design parameters, 10 capítulo 5, páginas 55-72, PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, M.A. Innis, D.H. Gelfand y J.J. Sninsky, Eds., 1999, Academic Press). Las amplificaciones se llevan a cabo en o condiciones isotermas o usando un ciclador térmico (por ejemplo, un ABI 9600 ó 9700 ó 7700 obtenido de PE Biosystems, Foster City, CA; véase Nucleic Acid Detection Methods, páginas 1-24, en Molecular Methods for Virus Detection, D.L. Wiedbrauk y D.H., Farkas, Eds., 1995, Academic Press). Los ácidos nucleicos amplificados se detectan usando cebadores de detección marcados con fluorescente (véase, por ejemplo, kit de reactivo de PCR Taqman<sup>TM</sup>, protocolo, número de referencia 15 del fabricante 402823, revisión A, 1996, PE Applied Biosystems, Foster City CA.) que se identifican y se sintetizan a partir de bases de datos públicamente conocidas como se describen para los cebadores de amplificación. En el presente caso, el ADN amplificado se detecta y se cuantifica usando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700 obtenido de PE Biosystems (Foster City, CA). Las cantidades de ARN específico contenidas en la muestra de prueba u obtenidas de las líneas celulares indicadoras pueden referirse a la cantidad relativa de fluorescencia observada (véase, 20 por ejemplo, Advances in Quantitative PCR Technology: 5' Nuclease Assays, Y.S. Lie y C.J. Petropolis, Current Opinion in Biotechnology, 1998, 9:43-48, o Rapid Thermal Cycling and PCR Kinetics, páginas 211-229, capítulo 14 en PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, M.A. Innis, D.H. Gelfand y J.J. Sninsky, Eds., 1999, Academic Press).

## 25 Ejemplo 2

*Diferentes estímulos inflamatorios dan lugar a diferentes conjuntos de datos de perfil de nivel inicial de manera que los perfiles de precisión calibrados para diferentes agentes en la misma clase de antiinflamatorios dan como resultado diferentes perfiles de firmas*

30 La figura 11 documenta la utilidad de diferentes estímulos inflamatorios para dar lugar a diferentes conjuntos de datos de perfil de nivel inicial de manera que los conjuntos de datos de perfil de precisión calibrados para los tres agentes antiinflamatorios probados dan como resultado diferentes perfiles de firmas. Los diferentes perfiles reflejan la diferencia en las dianas moleculares y mecanismos de acción de los tres agentes derivados de una única clase de agentes terapéuticos, los agentes antiinflamatorios. La figura también ilustra el extraordinario intervalo de detección (eje y) desde menos de 10 veces de diferencia del perfil calibrado hasta un aumento o disminución de más o menos 10E13 en la expresión génica cuando se compara con el calibrador. La comparación con el calibrador da como resultado perfiles de expresión génica que aumentan, disminuyen o sin cambio del conjunto calibrado.

40 La figura 11(a) muestra expresión génica relativa (síntesis de ARNm) en células estimuladas con estafilococos destruidos por calor (HKS) y el efecto de tres compuestos diferentes (TPCK, UT-77, y "Dex", o dexametasona). El compuesto TPCK produjo una disminución de 10 veces en la expresión relativa de IFN- $\gamma$  y disminuciones de 100.000 veces en la expresión de IL-4 y IL-5. Además, el compuesto UT-77 produjo incluso mayor magnitud de aumentos en la expresión relativa del gen que codifica IL-5, y aumentos más moderados en la expresión de IL-1 (superior a 10 veces) 45 y IFN- $\gamma$ . Tales efectos pueden ser sumamente significativos en etiologías de enfermedades y resultados y tienen valor pronóstico en lo referente a la utilidad como agentes terapéuticos de estos compuestos o entidades químicas similares o productos químicos que actúan similarmente. Las células de HKS son un modelo *in vitro* de infección de bacterias Gram-positivas.

50 La fig. 11(b) muestra análisis de expresión de los 12 genes en células tratadas con lipopolisacárido (LPS), un modelo *in vitro* de infección de bacterias Gram-negativas. Estos datos incluyen varias comparaciones sorprendentes con los datos en la fig. 11(a). Por tanto, el tratamiento con el agente terapéutico Dex produjo una sorprendente disminución en la expresión del gen IL-2 en células tratadas con LPS y un aumento sorprendente en la expresión de IL-2 en células tratadas con HICS (IKS). Pueden verse diferencias sorprendentemente grandes en la expresión génica en las 55 células diferentemente estimuladas para los genes IL-4 y IL-5. A diferencia, la expresión del gen para IFN respondió similarmente en células tratadas con cualquiera de los estímulos y cualquier de los agentes terapéuticos.

Por estos criterios se observó que la expresión de los genes para IL-2, IL-4 y IL-5 era marcadores candidatos o marcadores sustitutos en sistemas de modelos celulares para distinguir respuestas de las células a infección de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

## 60 Ejemplo 3

*Un único agente terapéutico para tratar un estado particular puede diferenciarse de un segundo agente terapéutico que también trata el estado particular mediante un perfil de firma para un panel dado de loci de genes*

La figura 12 muestra un conjunto de datos de perfil calibrados para un panel que tiene 8 constituyentes que son indicativos de un estado biológico que incluye inflamación. Los perfiles se muestran para tres agentes antiinflamatorios

diferentes -metotrexato, meclofenamato y metilprednisolona. Los conjuntos de datos de perfil calibrados para cada agente como se muestran representan un perfil de firma para ese agente. Este perfil de firma puede servir de un dispositivo para establecer control de calidad para un lote del agente. De hecho, se prevé que los compuestos o clases de compuestos en el mercado o en desarrollo puedan caracterizarse por un perfil de firma. El perfil de firma puede representarse en un formato gráfico, más particularmente como un gráfico de barras como se proporciona en la figura 12. Para la figura 12 se probó una muestra *ex vivo*. Se tomó una muestra de sangre del sujeto. Las alícuotas de la muestra se sometieron a lipopolisacárido (LPS) *ex vivo*. Después de 30 minutos, el agente antiinflamatorio se añadió como se indica a una alícuota de la muestra de sangre y después de aproximadamente otras 4 horas se determinó la expresión del panel de genes (IL-1a, IL-2, IL-8, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, IL-15, IFN-Gamma y TNF-a). Aunque el perfil calibrado de metotrexato y meclofenamato fueron similares, el perfil calibrado de metilprednisolona fue sustancialmente diferente. Las diferencias pueden reflejar las diferencias de los mecanismos o diana(s) de acción de este agente dentro de la clase general de compuestos antiinflamatorios. El nivel inicial es el conjunto de datos de perfil para lipopolisacárido en ausencia de cualquier agente adicional.

15 Ejemplo 4

*Hay variabilidad relativamente baja respecto al perfil dentro de un único individuo respecto al tiempo cuando el perfil de precisión calibrado se determina de la medición de expresión génica a lo largo de muchos loci de genes que se han inducido apropiadamente*

20 La figura 13(a), (b) y (c) muestra una representación gráfica de conjuntos de datos de perfil de precisión calibrados para dos muestras diferentes de sangre completa. Se recogió sangre completa heparinizada de un único voluntario sano normal en dos veces separadas más de 2 semanas. La figura 13a para la muestra 991116 y la figura 13b para la muestra 991028 reflejan el estado biológico de las células probadas del único donante que usa un panel (es decir, el panel de 25 inflamación) de 24 miembros en respuesta a estimulación con uno de tres agentes diferentes. El nivel inicial en este ejemplo se deriva de células sin tratar obtenidas del mismo individuo. Los perfiles calibrados se muestran para células expuestas durante 4 a 6 horas a lipopolisacárido (LPS), estafilococos destruidos por calor (HKS) y fitohemaglutinina (PHA). La figura 13c muestra una comparación directa de muestra de sangre 991116 estimulada con LPS respecto a muestra de sangre 991028, es decir, se usa 991028 como el calibrador o conjunto de datos de perfil de nivel inicial. 30 Los niveles de ARN mensajero medidos el 28/10/99 se usaron para comparar los niveles de ARN mensajero medidos el 16/11/99. Una identidad perfecta de niveles de ARN estaría representada por una línea fija en la unidad. Estos datos muestran claramente que para expresión génica de nivel inicial puede ser nada menos que una diferencia de 8 veces (c-jun) en niveles de ARN mensajero. Sin embargo, para la mayoría de los genes medidos, los niveles de ARN mensajero medidos en un día están dentro de 2-3 veces de aquellos medidos en un día diferente. 13(d) es similar a 13(c) excepto 35 que las células no se estimularon con LPS.

La figura documenta la variabilidad relativamente baja respecto al perfil dentro de un único individuo respecto al tiempo en el que se determina el perfil de precisión calibrado de la medición de expresión génica a lo largo de muchos loci de genes que se han inducido apropiadamente. La figura ilustra (1) los efectos específicos de clase (generalmente 40 inflamatorios como se determinan por el efecto en loci de genes proinflamatorios, por ejemplo, TNF-alfa, IL-1 alfa y IL-1 beta), (2) diferencias cuantitativas de efectos específicos de agente entre cada uno de los agentes en los mismos loci de genes (por ejemplo, IL-2) y (3) efectos reproducibles y por tanto predecibles en la población de sujetos, TK (figura 13c).

45 Ejemplo 5

*Similitudes y diferencias en el efecto de un único agente en poblaciones de células que se diferencian en su estado biológico*

50 Los análisis de expresión génica *ex vivo* pueden realizarse obteniendo la sangre de un sujeto, por ejemplo, sacando la sangre en un tubo vacutainer con heparina sódica como anticoagulante. Un antiinflamatorio tal como 3-metilprednisolona a una concentración final de 10 micromolar se añadió a la sangre en un tubo de polipropileno, se incubó durante 30 minutos a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Después de 30 minutos se añadió un estímulo tal como LPS a 10 ng/ml o estafilococos destruidos por calor (HKS) a dilución 1:100 a sangre completa tratada con fármaco. La incubación continuó a 55 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 6 horas a menos que se indique lo contrario. Se lisaron eritrocitos en disolución de lisis RBC (Ambion) y las células restantes se lisaron según el módulo RNAqueous-blood de Ambion (nº de catálogo 1913). El ARN se eluyó en disolución de elución Ambion. El ARN se trató con ADNs<sub>a</sub> con 1 unidad de ADNs<sub>a</sub> I (Ambion, nº 2222) en tampón ADNs<sub>a</sub> 1X a 37°C durante 30 minutos. La primera síntesis de cadenas se realizó usando el kit de transcriptasa inversa TaqMan de Perkin-Elmer con transcriptasa inversa MultiScribe (nº de catálogo N808-0234). 60 La comprobación de la calidad de las reacciones de RT se realizó con química de PCR de Taqman usando los reactivos de ensayo previamente desarrollados ARNr 18S (PDAR) de PE Biosystems (número de referencia del fabricante 4310893E). El ensayo de PCR se realizó en de 6 a 24 genes en cuatro repeticiones en 7700 de PE Biosystems. Los ensayos de PCR se realizaron según memorias descriptivas explicadas resumidamente con el producto de PDAR. La cuantificación relativa del gen de interés se calibró contra una expresión de ARNr 18S como se describe en el boletín 65 de usuario 2 de productos PE (1997) y elaborado en Hirayama y col. (Blood 92,1998:46-52) usando 18S en lugar de GAPDH.

## ES 2 290 046 T3

La cuantificación relativa del ARNm se midió por la diferencia en ciclos umbral entre 18S y el gen de interés. Entonces, esta delta  $C_T$  se comparó con el estado normalizado, cualquier sujeto antes del tratamiento o estímulos sin fármaco en un ensayo *ex vivo* para medir la “inducción plegable” representada en los gráficos de barras. (figura 14). Por ejemplo, en el gráfico anterior, los niveles de IFN son 1/50 menos en el día 3 que antes del tratamiento.

5

### Ejemplo 6

#### *Las muestras in vivo y ex vivo proporcionan perfiles de firma comparables*

10 La figura 15 muestra el conjunto de datos de perfil calibrados para dos sujetos (sujeto 1 y sujeto 2) que han sido tratados durante un periodo de tres días con una dosis habitual de los corticosteroides dexametasona. La sangre de cada sujeto se obtuvo 72 horas después y se determinó una medida cuantitativa de la cantidad de ARN correspondiente a los constituyentes del panel. Aunque el conjunto de datos de perfil calibrados para cada sujeto fue similar para la mayoría de los loci de genes, también se detectaron algunas diferencias notables, por ejemplo para IL-2, IL-10, IL-6 y GM-CSF. También se muestra un conjunto de datos de perfil calibrados para comparar una muestra *ex vivo* de sangre de la muestra 1 antes del tratamiento con corticosteroide en la que la muestra *ex vivo* se somete a una cantidad equivalente de corticosteroide *in vitro* como se calcula para ser el nivel de plasma en el sujeto. La similitud en el conjunto de datos de perfil calibrados para muestras *ex vivo* cuando se compara con muestras *in vivo* proporciona apoyo para un ensayo *in vitro* que predecirá la acción *in vivo* del compuesto. Se ha observado un efecto comparable similar entre 15 muestras *in vivo* y *ex vivo* infectadas con un agente infeccioso, más particularmente agentes bacterianos o virales. Por tanto, se ha concluido que las muestras *ex vivo* proporcionan un procedimiento eficaz para determinar el efecto de 20 un único compuesto o múltiples compuestos en un paciente, en el que los múltiples compuestos pueden usarse o en combinación, en paralelo o consecutivamente para optimizar la selección de un agente para un estado biológico para el sujeto.

25

### Ejemplo 7

#### *Demostración de la reproducibilidad de una respuesta in vitro con un antiinflamatorio autorizado en 5 sujetos donantes diferentes*

30

La comparación y el análisis de las figuras 18a a 18e demuestra la consistencia del efecto del estímulo y el tratamiento *in vitro* con un antiinflamatorio autorizado en 5 donantes diferentes (cada figura representa un único donante). El uso de un estímulo conocido y probado da como resultado una respuesta génica sumamente reproducible *in vitro* que puede correlacionarse con una respuesta *in vivo* predecible. Las figuras 18a-18e proporcionan los resultados de 35 análisis de 5 donantes de los que se ha tomado una muestra de sangre. Las muestras de sangre se expusieron a un agente terapéutico a diversas concentraciones que oscilaban de 0,1  $\mu$ M a 5  $\mu$ M, más particularmente 0,1  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M y 5  $\mu$ M, durante un periodo de 4 horas. Resultaron diferentes concentraciones de fármaco en un conjunto 40 de datos de perfil calibrados para un panel de inflamación a cada concentración que era cualitativamente diferente de la siguiente. La figura 18a se corresponde con el donante 1, la figura 18b se corresponde con el donante 2, la figura 18c se corresponde con el donante 3, la figura 18d se corresponde con el donante 4 y la figura 18e se corresponde con el donante 5. Cada individuo varió del otro y también proporcionó un perfil variable para una concentración diferente. Este conjunto de figuras ilustra el alto nivel de información que puede obtenerse de conjuntos de datos de perfil calibrados.

45

### Ejemplo 8

#### *Un conjunto de datos de perfil calibrados puede proporcionar un perfil de firma para una mezcla compleja de compuestos*

50

La figura 21 ilustra el efecto de tres hierbas antiinflamatorias diferentes en un panel de constituyentes que incluye constituyentes de un panel inflamatorio (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ICAM, IL-8, IL-10, IL-12p40, ICE, cox-2, cox-1 y mmp-3), un panel de crecimiento y diferenciación celular (c-fos, c-jun y STAT3), un panel de toxicidad (SOD-1, TACE, GR, HSP70, GST, c-fos, c-jun, INOS) y un panel de metabolismo hepático (INOS, cyp-a y u-pa). Las células ensayadas en la figura 21 son alícuotas de sangre de un sujeto que se exponen *ex vivo* a lipopolisacárido y a equinácea (SPM9910214), árnica (SPM9910076) y ginseng de Siberia (SPM9910074), aplicándose cada uno de los nutracéuticos a la muestra de sangre a la misma concentración de 200 ug/ml. El nivel inicial es la muestra de células con lipopolisacárido en ausencia de un nutracéutico. Cada nutracéutico (formado de una mezcla compleja) tiene un perfil de firma característico justamente como los agentes antiinflamatorios farmacéuticos de un único compuesto. El perfil de firma puede proporcionarse en forma de gráfica que puede usarse para identificar un herbal, a la vez que proporciona información referente a sus 55 propiedades y su eficacia para un único sujeto o para una población media de sujetos.

60

### Ejemplo 9

#### *Un ensayo de control de calidad para tipos de equinácea usando conjuntos de datos de perfil calibrados*

65

La figura 24 muestra una representación gráfica de los conjuntos de datos de perfil calibrados para cuatro tipos comerciales diferentes de tipos de equinácea usando un panel de inflamación. Como se espera, SPM007 y SPM003 dieron perfiles calibrados de firma similares a muestras SPM010 y SPM016 de equinácea auténtica, aunque marcados

y comercializados como equinácea cuando se probaron usando el sistema descrito en la figura 14 resultaron perfiles calibrados de firma que eran sustancialmente similares al perfil obtenido con lipopolisacárido solo. Se encontró que las muestras de equinácea SPM010 y SPM016 tenían niveles activos sumamente biológicos elevados de endotoxina, mientras que los niveles de LPS niveles en SP007 y SP003 fueron indetectables. Un perfil de firma almacenado para 5 equinácea activa obtenido de un panel diseñado para probar la eficacia y modo de acción, por ejemplo el panel de inflamación, permite la evaluación de nuevos lotes de equinácea, diferenciación de tipos existentes o nuevos de equinácea, guiar el aislamiento y desarrollo de nuevos compuestos con actividades diferentes o similares de un compuesto complejo similar a equinácea o pueden usarse en el desarrollo de aseguramiento de la calidad en la producción, análisis 10 y venta de compuestos nuevos o previamente comercializados. En el ejemplo citado, dos de los tipos de equinácea SP010 y SP016 dan como resultado perfiles calibrados que son característicos de equinácea auténtica.

Ejemplo 10

*Comparación de tres preparaciones herbales usando una línea celular indicadora*

15 Las figuras 25 (a)-(c) proporcionan conjuntos de datos de perfil calibrados para tres preparaciones herbales respecto a una línea celular indicadora (THP-1) en vez de una muestra de sangre de un sujeto. En la figura 25(a), el nivel inicial es el conjunto de datos de perfil para células THP-1 ausentes del herbal, mientras que los histogramas representan los conjuntos de datos de perfil calibrados para el mismo herbal de tres fuentes de fabricación diferentes de la misma hierba 20 a 250 ug/ml. Los resultados de expresión génica se muestran en una escala logarítmica. Similar a la observación en la figura 14, éstos demuestran que compuestos similarmente marcados obtenidos de diferentes fuentes tienen diferencias demostrables y cuantificables en perfiles calibrados usando un panel específico, por ejemplo el panel de inflamación diseñado para obtener información sobre la expresión de productos génicos relacionados con inflamación e infección. Esto sugiere que los compuestos tienen probablemente eficacias diferentes cuando se usan para fines específicos.

25 La figura 25(b) proporciona una comparación del perfil calibrado de una única hierba a tres concentraciones usando la línea celular indicadora THP-1. El conjunto de datos de perfil de nivel inicial es células THP-1 sin tratar. El análisis de los datos sugiere una respuesta dependiente de la concentración en las líneas celulares indicadoras que, aunque se demuestra en este documento, puede ser indicativa de una respuesta similar en sujetos.

30 La figura 25(c) proporciona una comparación de cuatro tipos comerciales de equinácea usado a la misma concentración y probados contra un panel de constituyentes usando una línea celular THP-1 como una población de células indicadoras. La expresión diferencial, como se revela mediante diferencias en los perfiles calibrados, permite que se hagan comparaciones directas de compuestos complejos. Por ejemplo, el análisis de las diferencias en los perfiles calibrados podría usarse para guiar el aislamiento y desarrollo de compuestos, diferenciación de productos en el mercado 35 o usarse por el consumidor o profesional de la salud para guiar la elección individualizada de un único compuesto de una clase de compuestos similares que puede ser apto para un estado biológico particular.

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

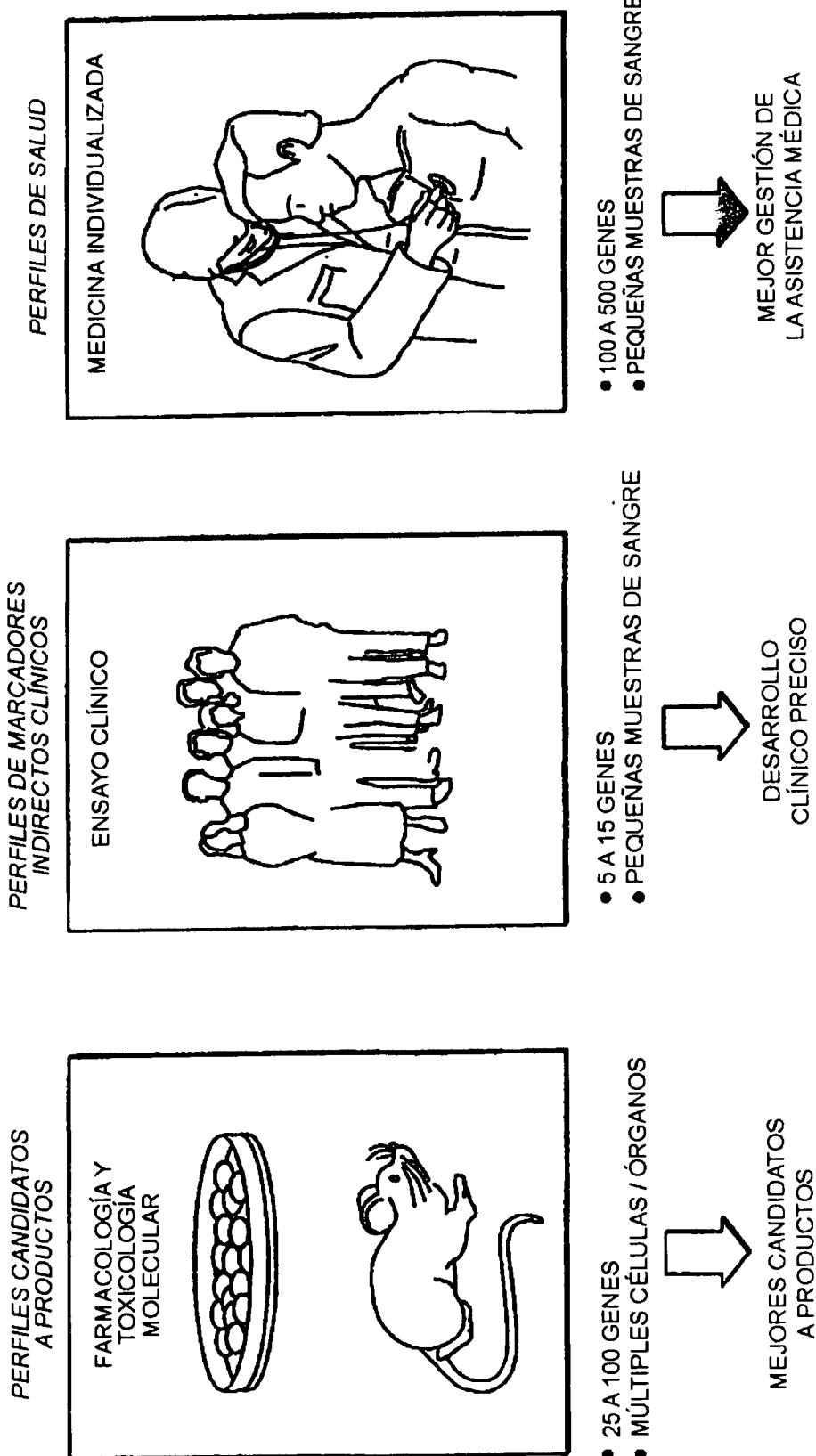
1. Un procedimiento para evaluar un estado biológico de un sujeto, basado en una primera muestra obtenida del sujeto, proporcionando la muestra una fuente de ARN; **caracterizado** porque el procedimiento comprende:
- 5 (a) derivar de la primera muestra un primer conjunto de datos de perfil, comprendiendo el primer conjunto de datos de perfil 3 o más miembros, siendo cada miembro una medida cuantitativa relativa de la cantidad en dicha primera muestra de un constituyente de ARN transcrita distinto en un panel de constituyentes seleccionado tal que la medición de dichos constituyentes permita la evaluación de dicho estado biológico, determinándose la cuantificación relativa de ARNm en dicha muestra mediante la realización de PCR cuantitativa en ARN extraído de la muestra con una eficiencia de amplificación definida para los transcritos diana y determinando la diferencia en ciclos umbral ( $\Delta C_T$ ) entre un marcador de tamaño y los transcritos diana de interés; y
- 10 (b) producir un conjunto de datos de perfil calibrados para el panel, siendo cada miembro del conjunto de datos de perfil calibrados una función de un miembro correspondiente del primer conjunto de datos de perfil y un miembro correspondiente de un conjunto de datos de perfil de nivel inicial para el panel; en el que el conjunto de datos de perfil calibrados representa un conjunto de valores en el que un modelo de variación se correlaciona de un modo reproducible con un estado particular.
- 15 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además distinguir entre dos estados biológicos mediante la realización (a) y (b) para cada de los dos estados biológicos.
- 20 3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la función incluye una relación de tales miembros.
- 25 4. Un procedimiento según la reivindicación 3, en el que la función incluye un logaritmo de la relación.
- 30 5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el estado biológico es un proceso patológico complejo que implica múltiples genes, siendo la enfermedad de un tipo que implica al menos uno de inflamación, enfermedad autoinmune, enfermedad degenerativa, alergia, enfermedad vascular, isquemia, cáncer, enfermedad del desarrollo, estado hormonal, envejecimiento y enfermedad infecciosa.
- 35 6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que el estado se **caracteriza** por inflamación y el panel incluye al menos uno de IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL2p40, IL-18, GMCSF, IFN-gamma, TGF-b, cox-1, cox-2, ICE, mmp-3, mmp-9, ICAM, TNF-a y TNF-b.
7. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de sangre.
- 40 8. Un procedimiento según cualquiera de reivindicaciones 1 a 4, en el que el estado se **caracteriza** por metabolismo hepático y el panel de constituyentes es un panel de metabolismo hepático.
9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el estado biológico es una toxicidad y el panel de constituyentes es un panel de toxicidad.
- 45 10. Un procedimiento según la reivindicación 9, en el que la toxicidad es una reacción adversa a un fármaco.
11. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho primer conjunto de datos de perfil comprende al menos 5 miembros.

50

55

60

65



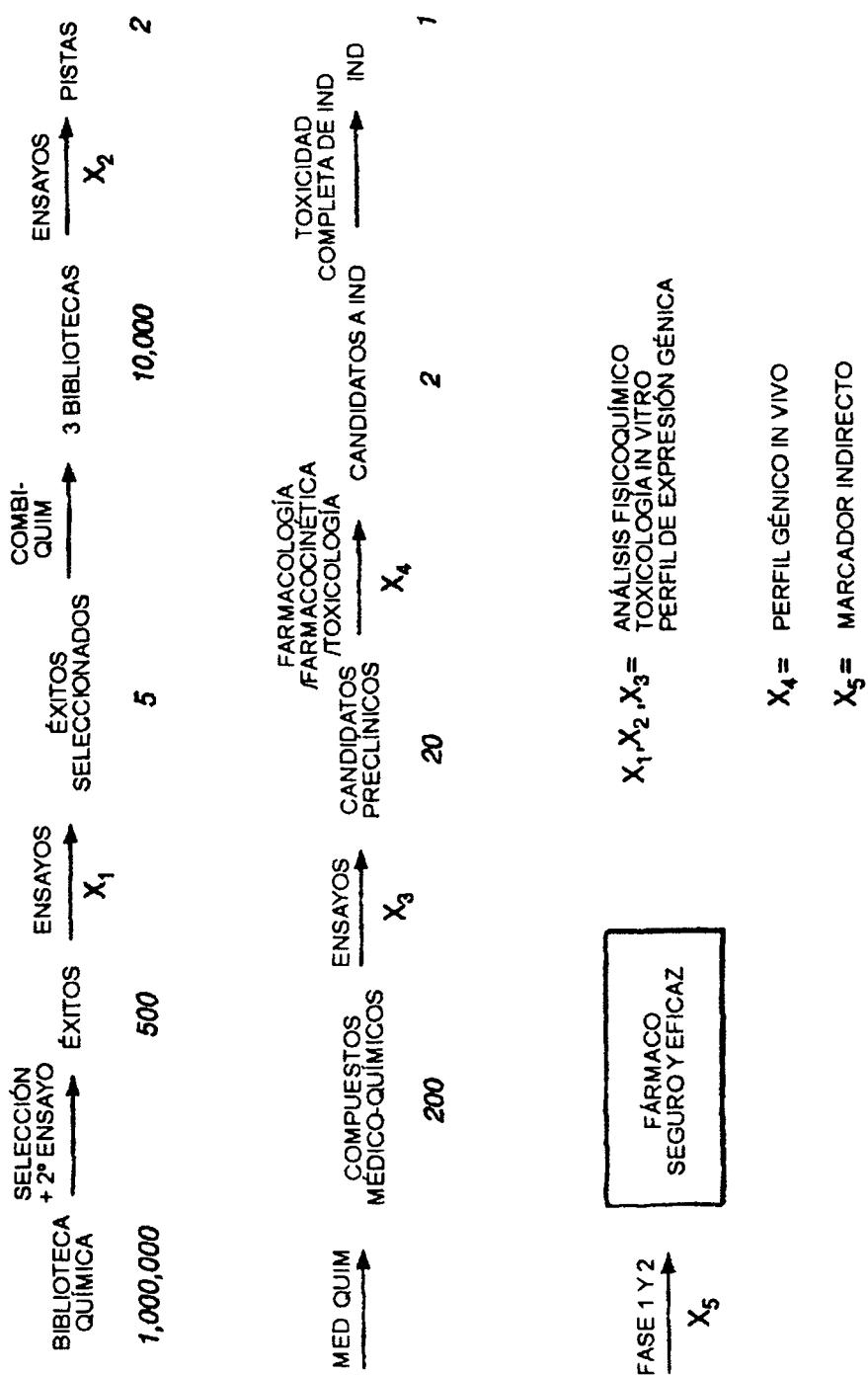


FIG. 2

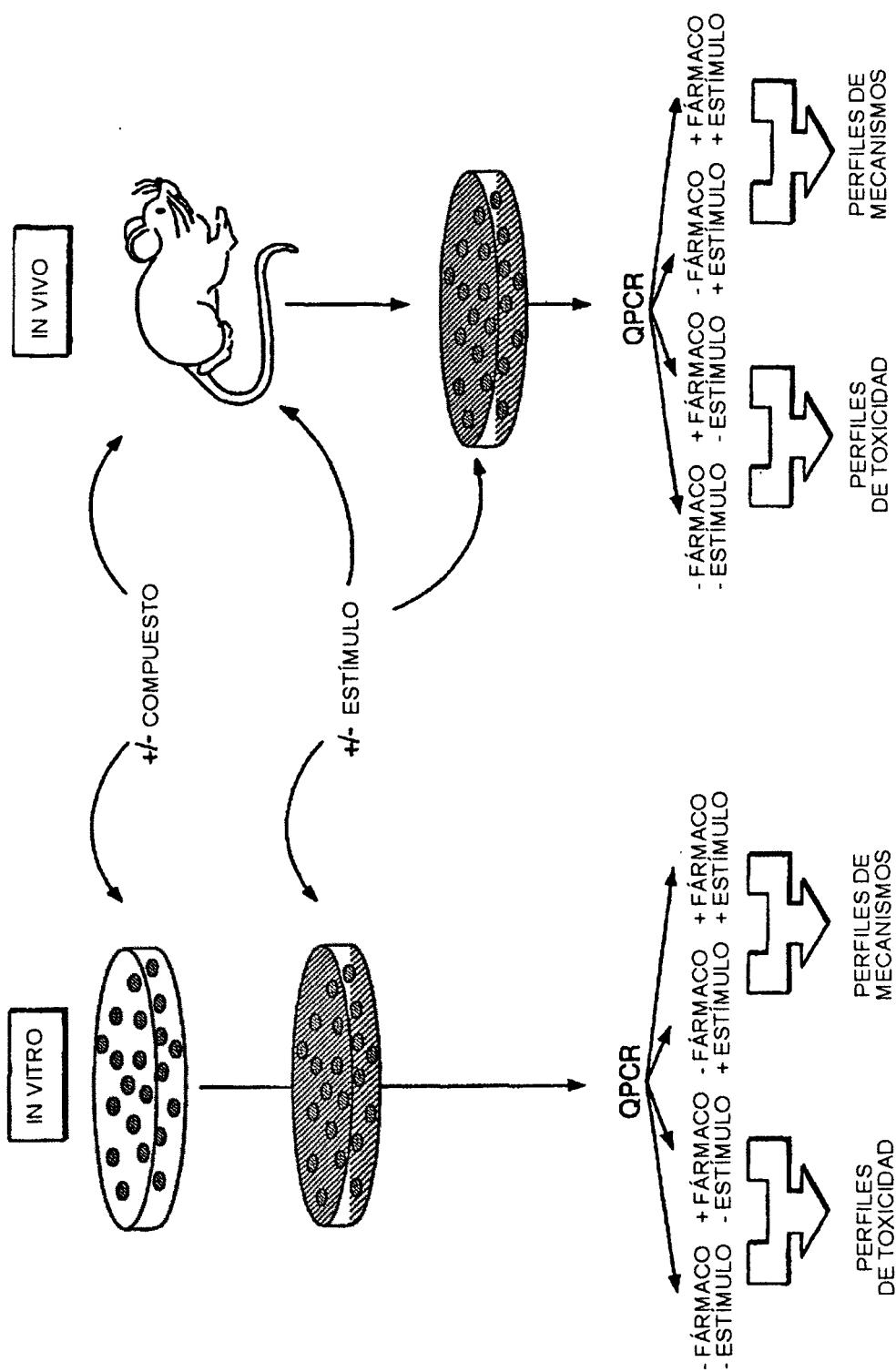


FIG. 3

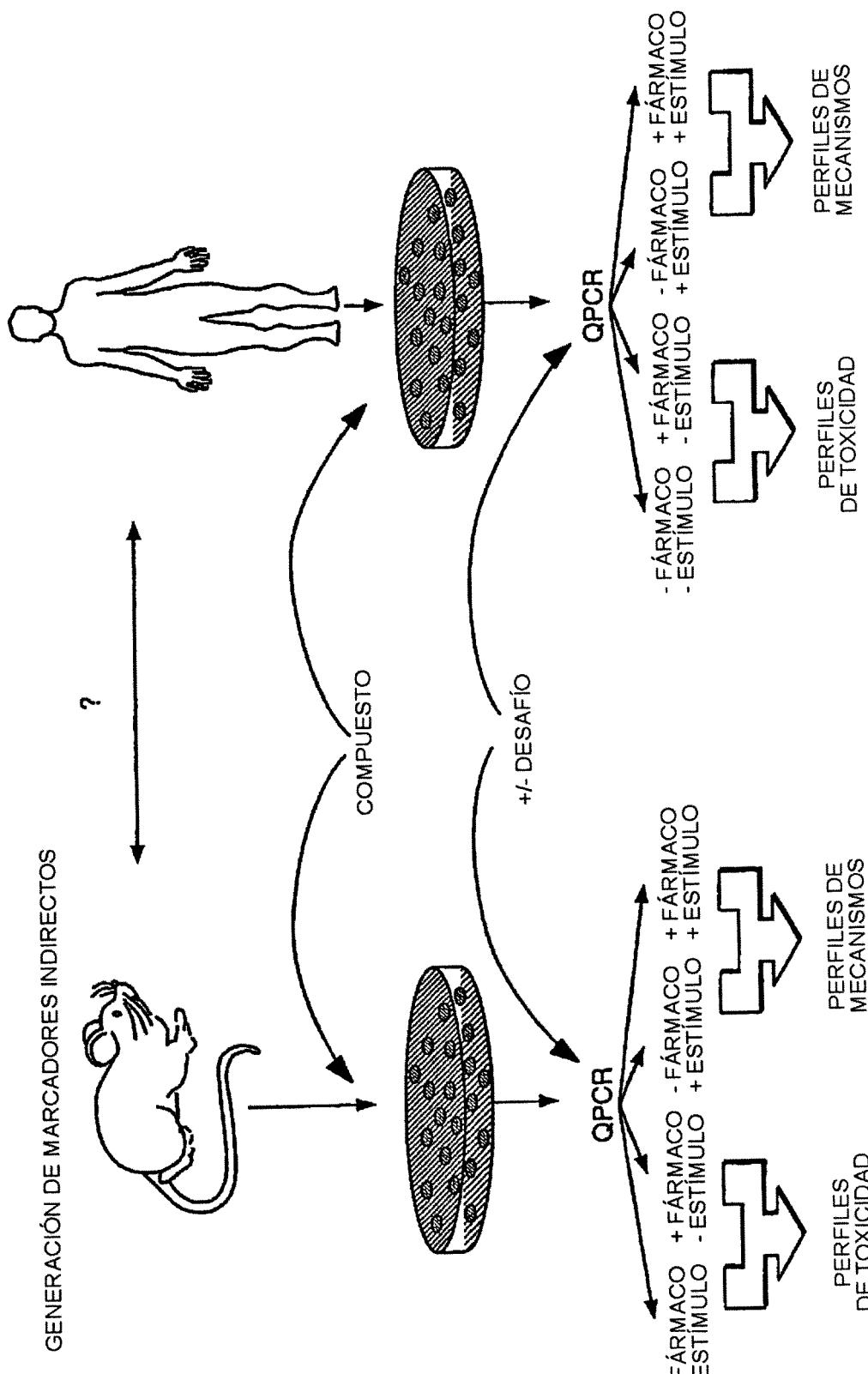


FIG. 4

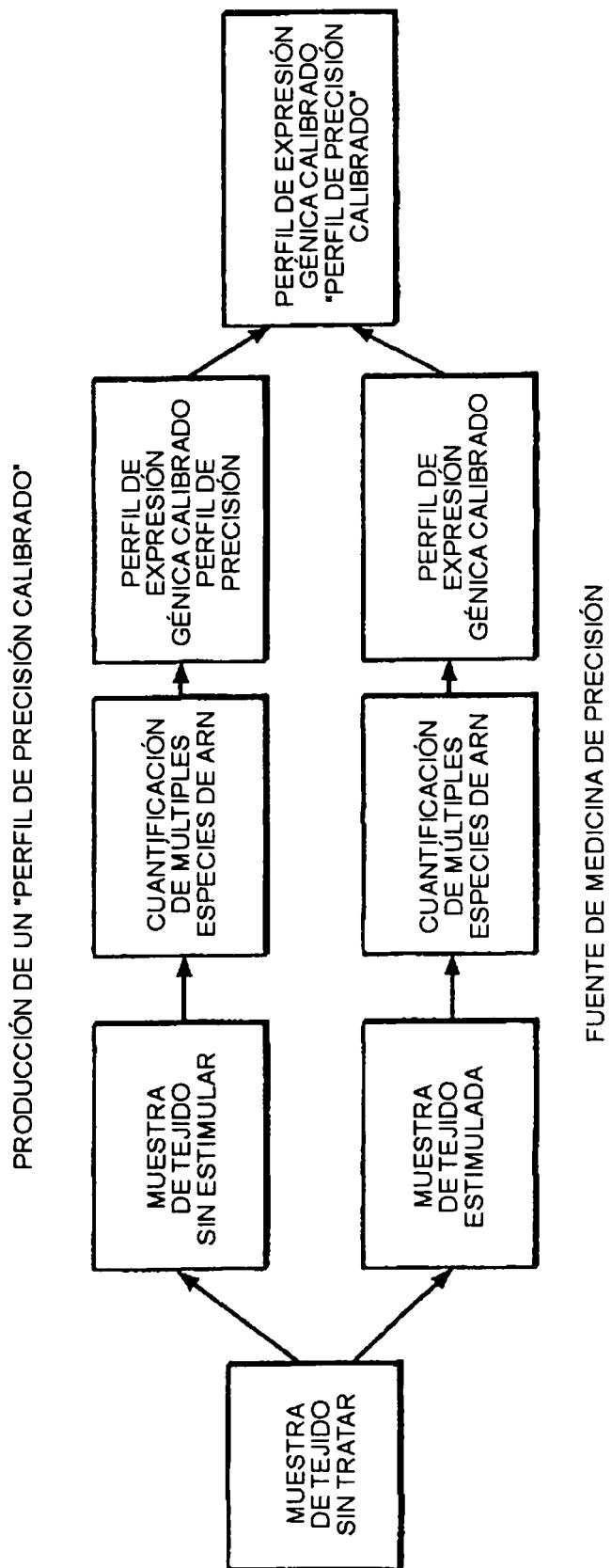


FIG. 5

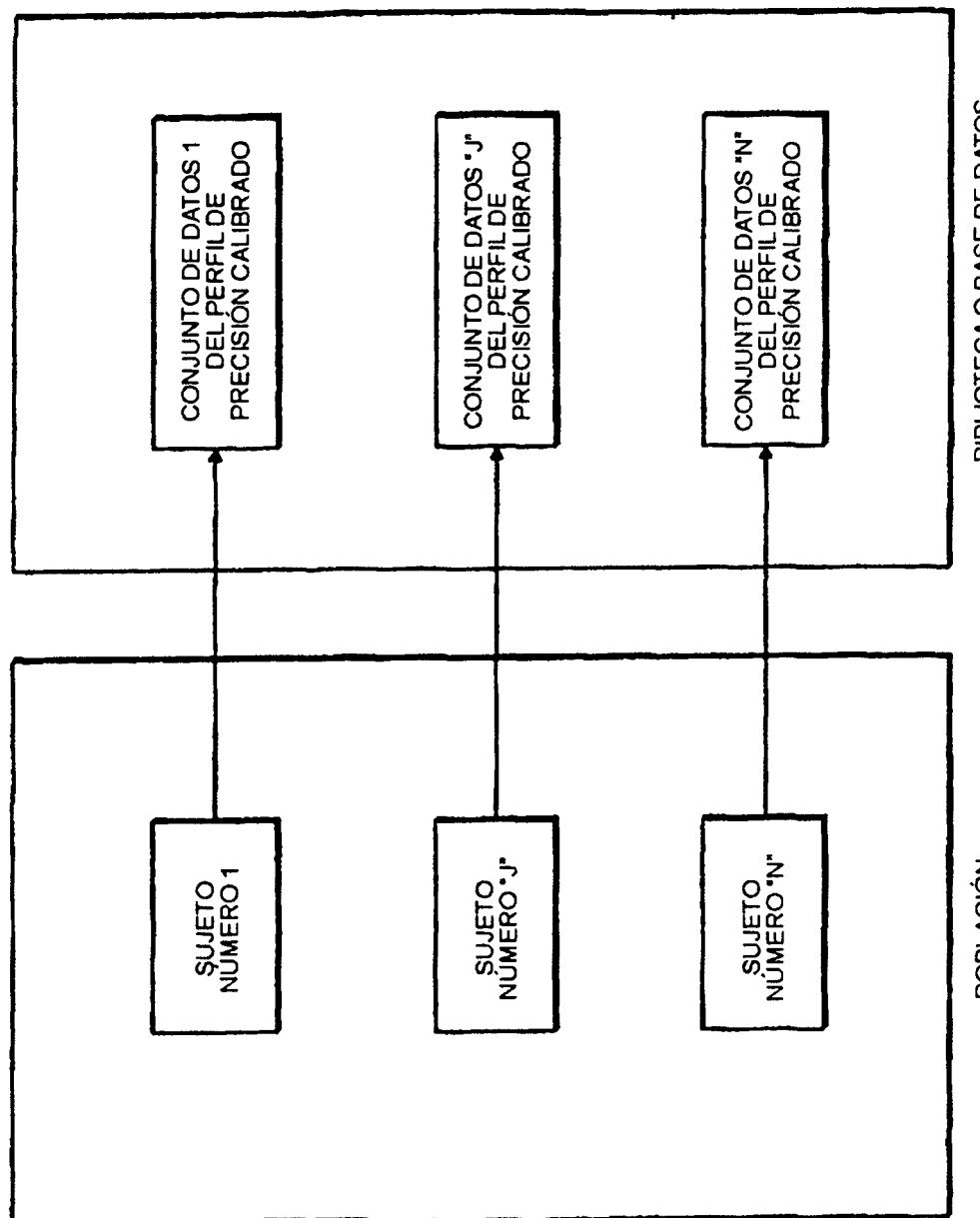


FIG. 6

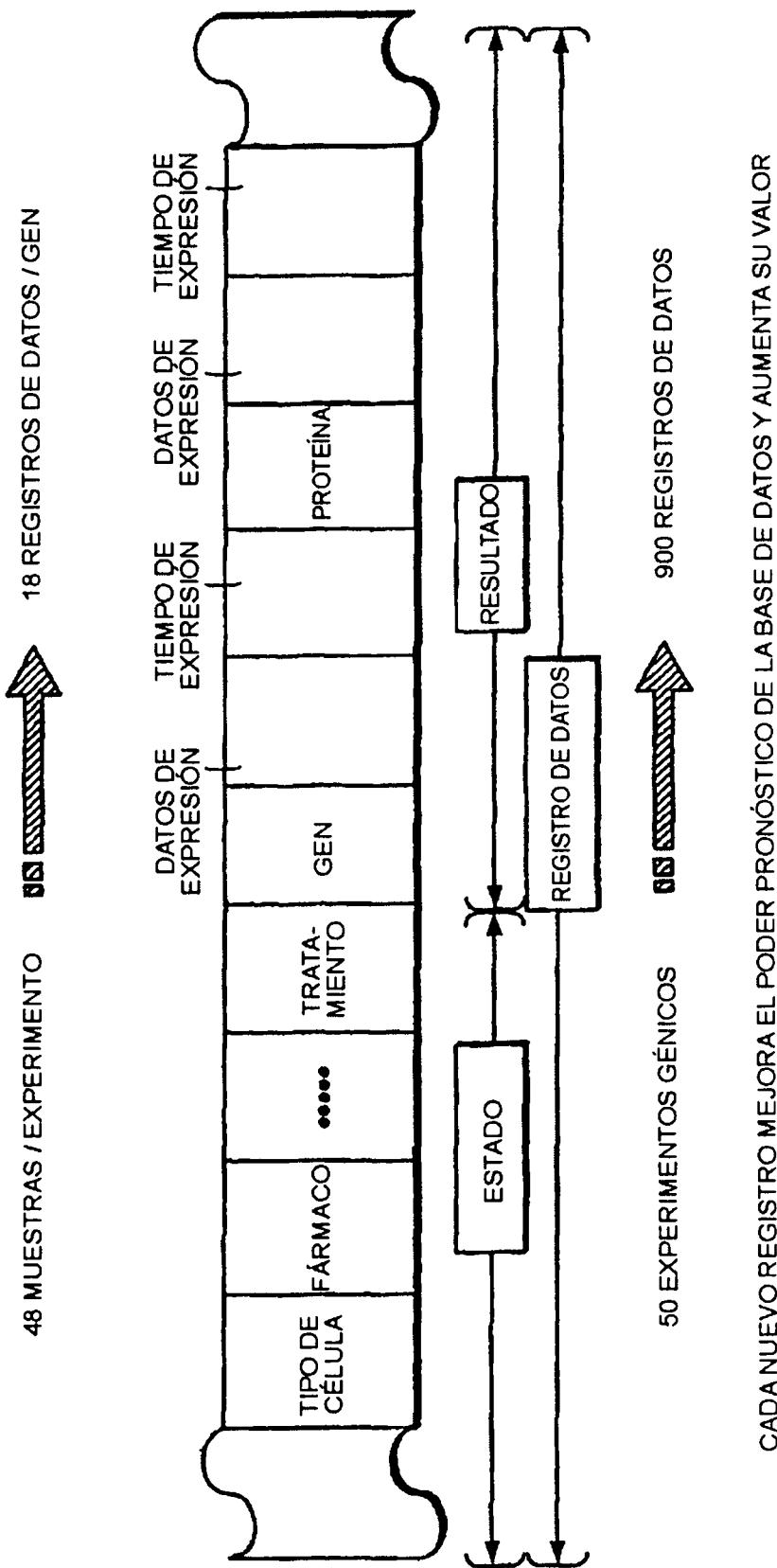
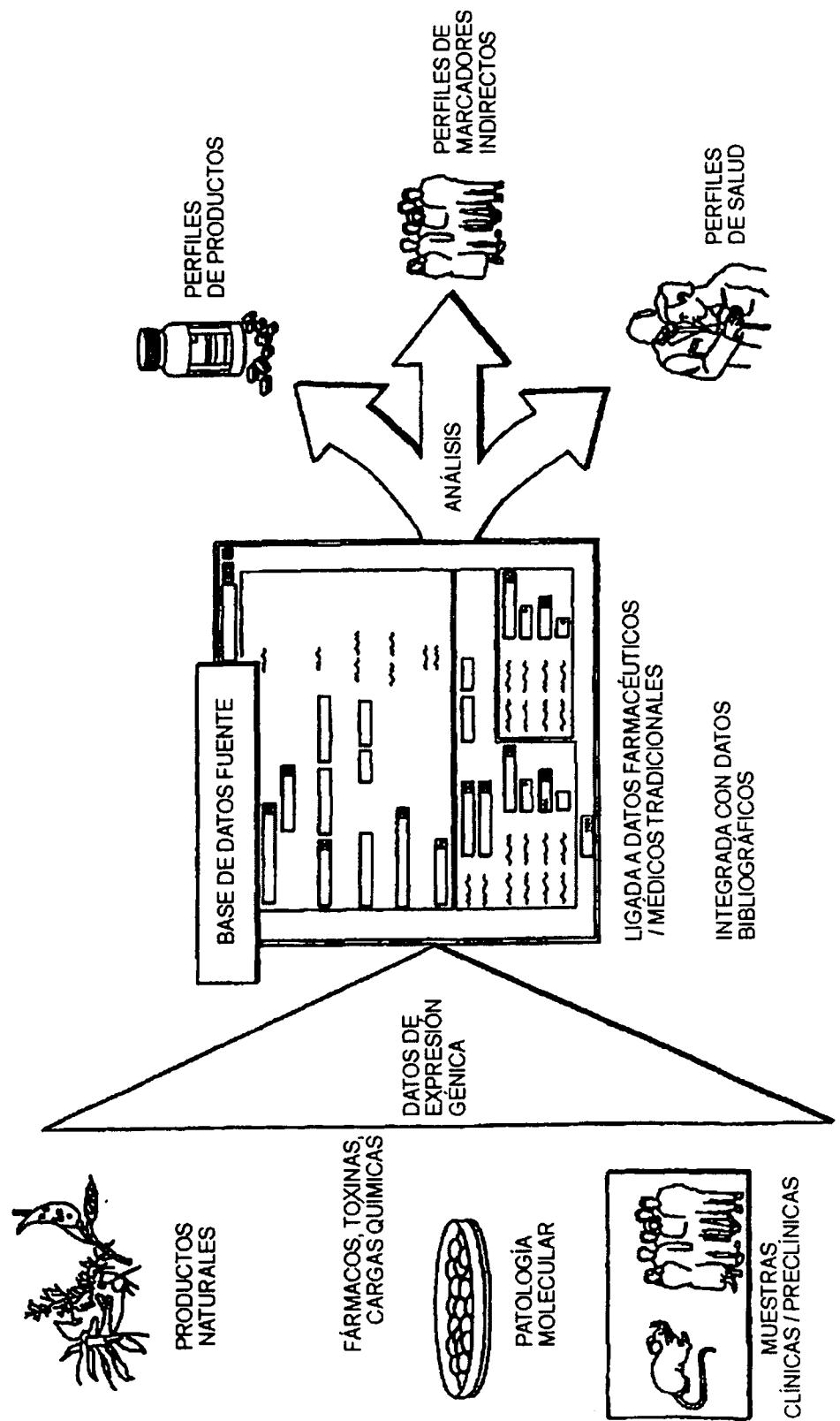


FIG. 7



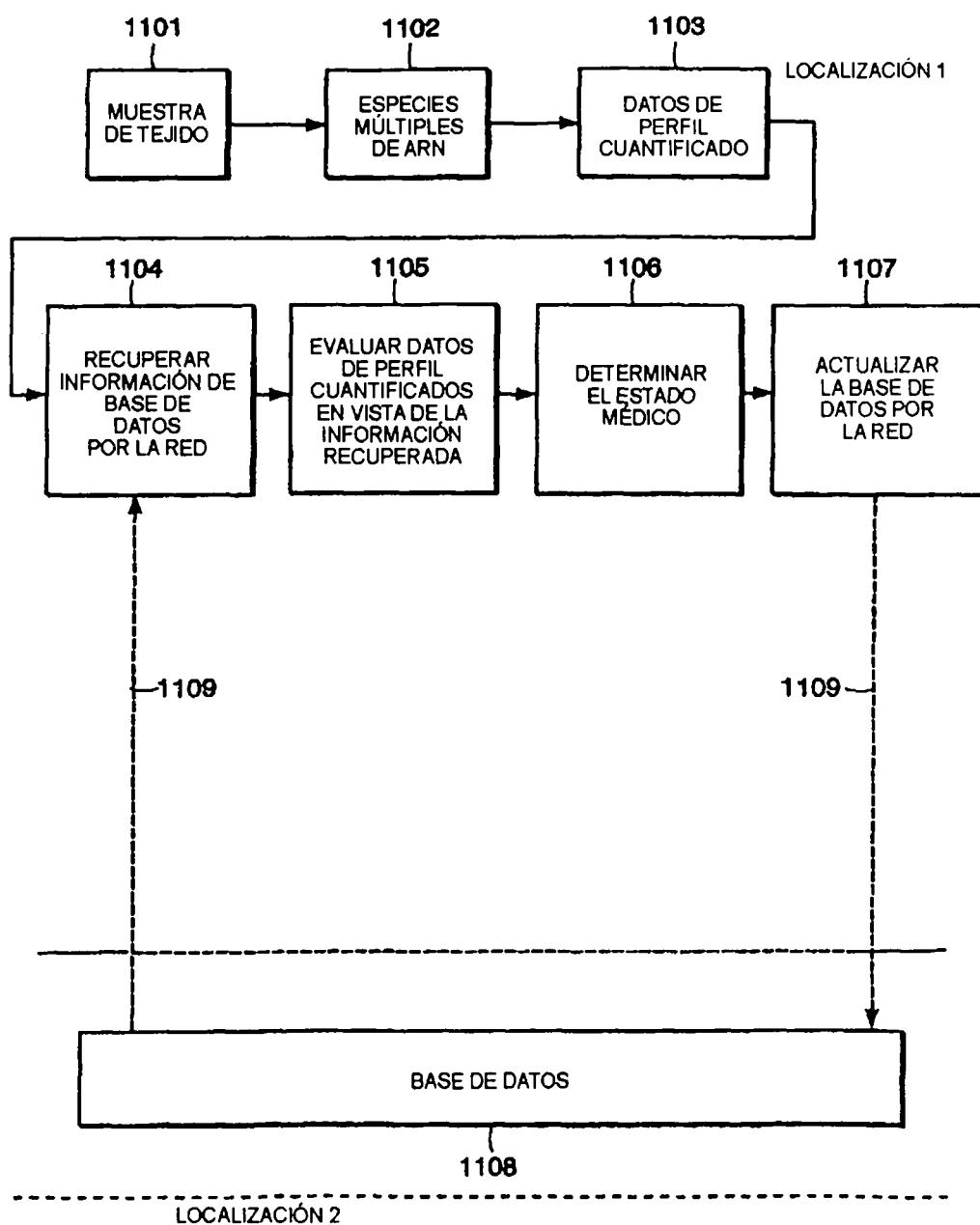


FIG. 9

DISEÑO DE ENSAYO CLÍNICO DE FASE DOS USANDO PERFILES DE PRECISIÓN

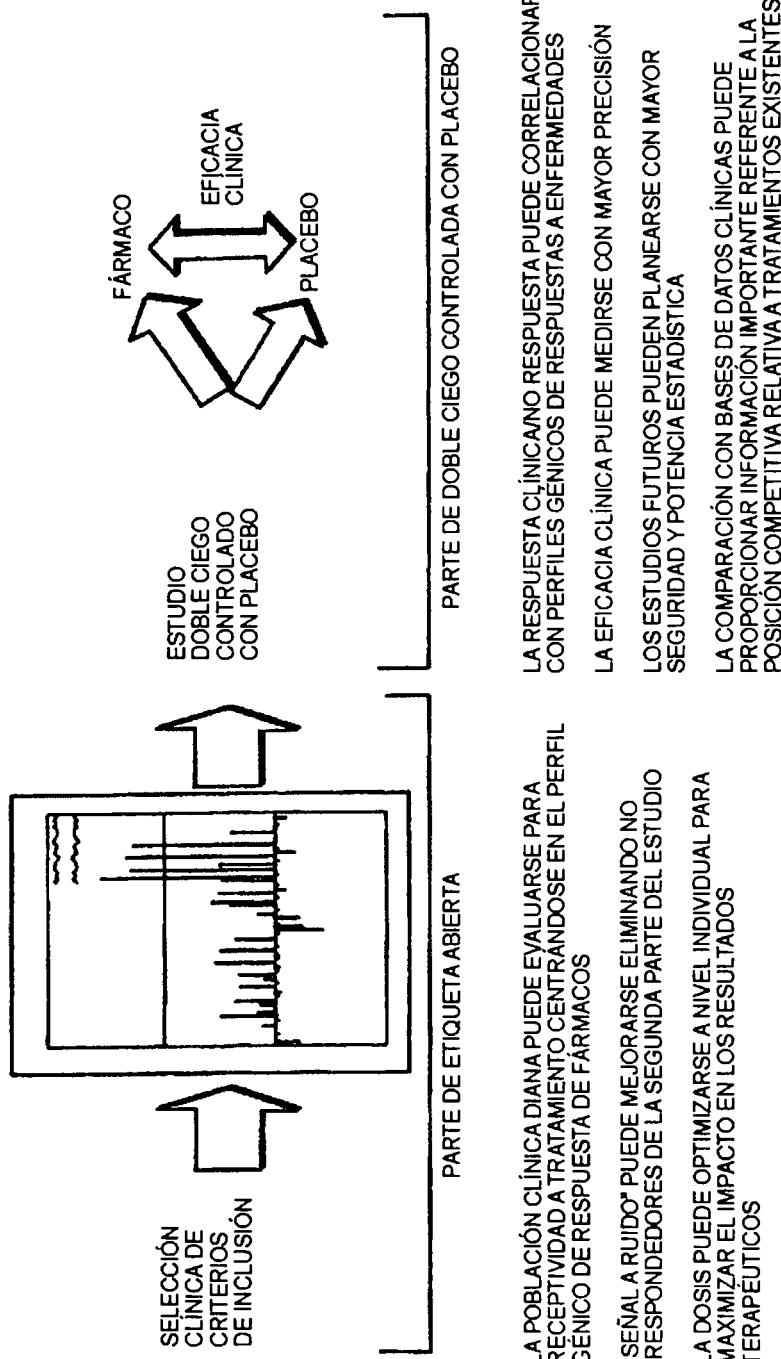


FIG. 10a

FIG. 10b

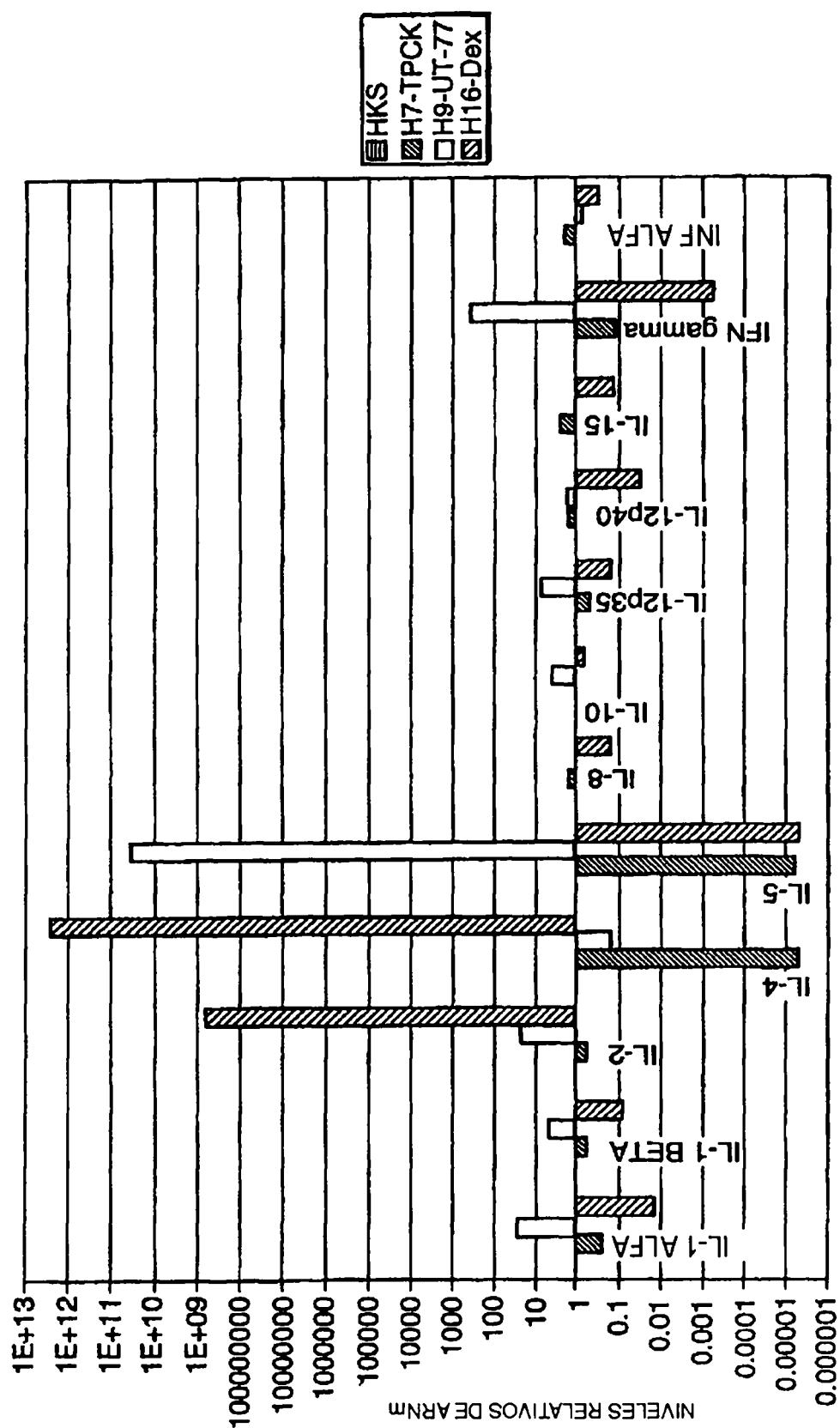
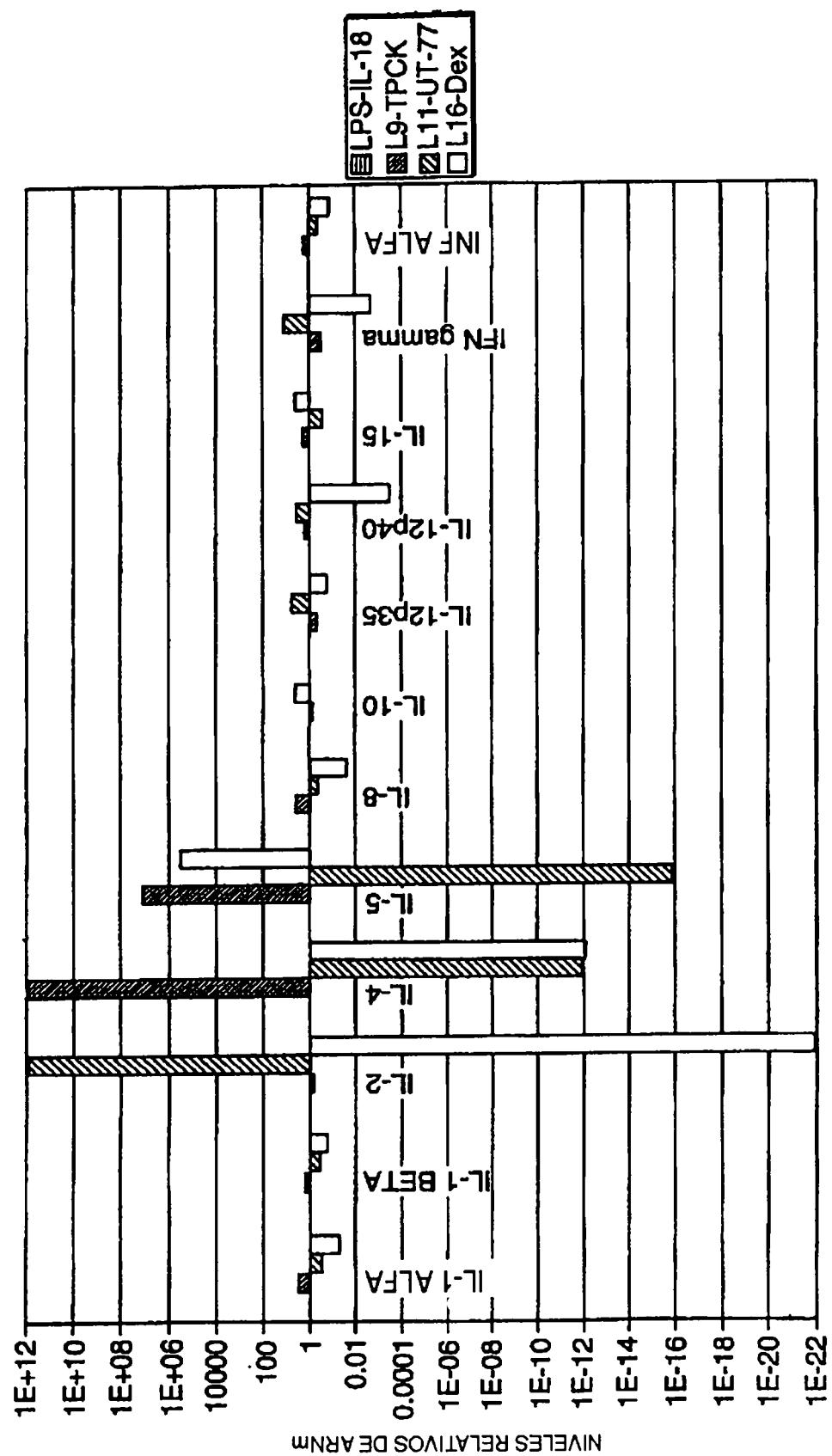


FIG. 11a



EL PERFIL DE FÁRMACO COMPARATIVO MUESTRA DIFERENCIAS ENTRE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS CON DIFERENTES MECANISMOS DE ACCIÓN

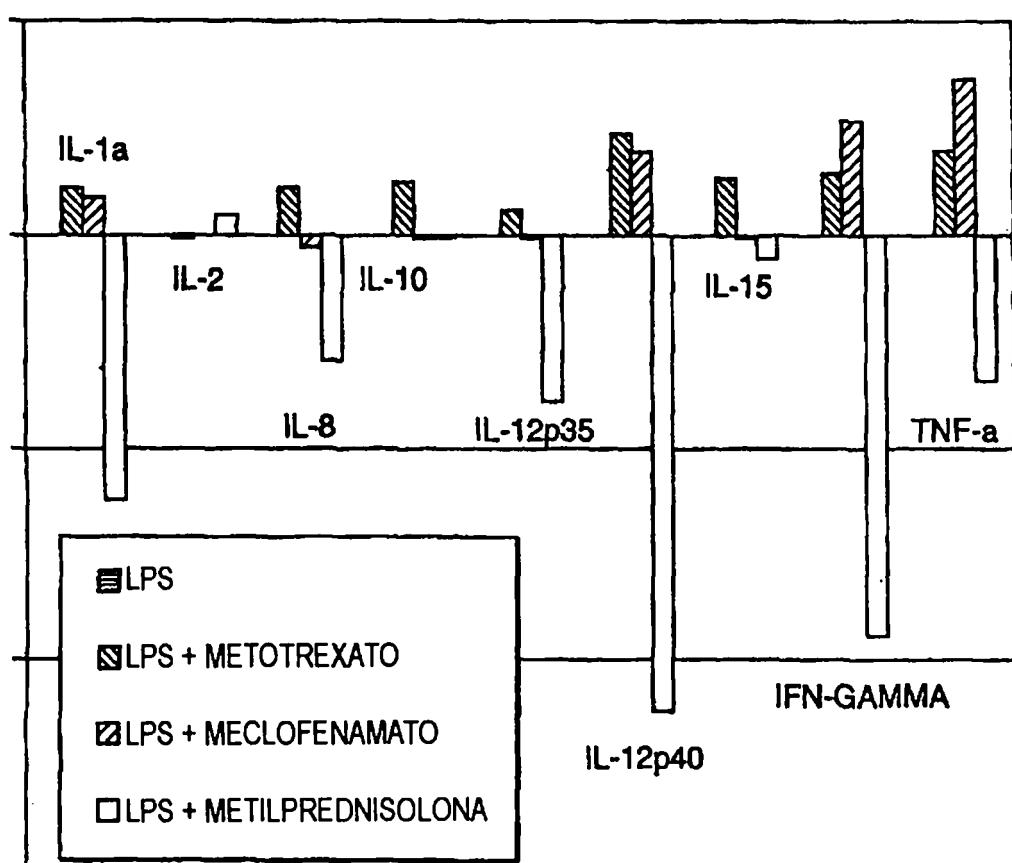


FIG. 12a

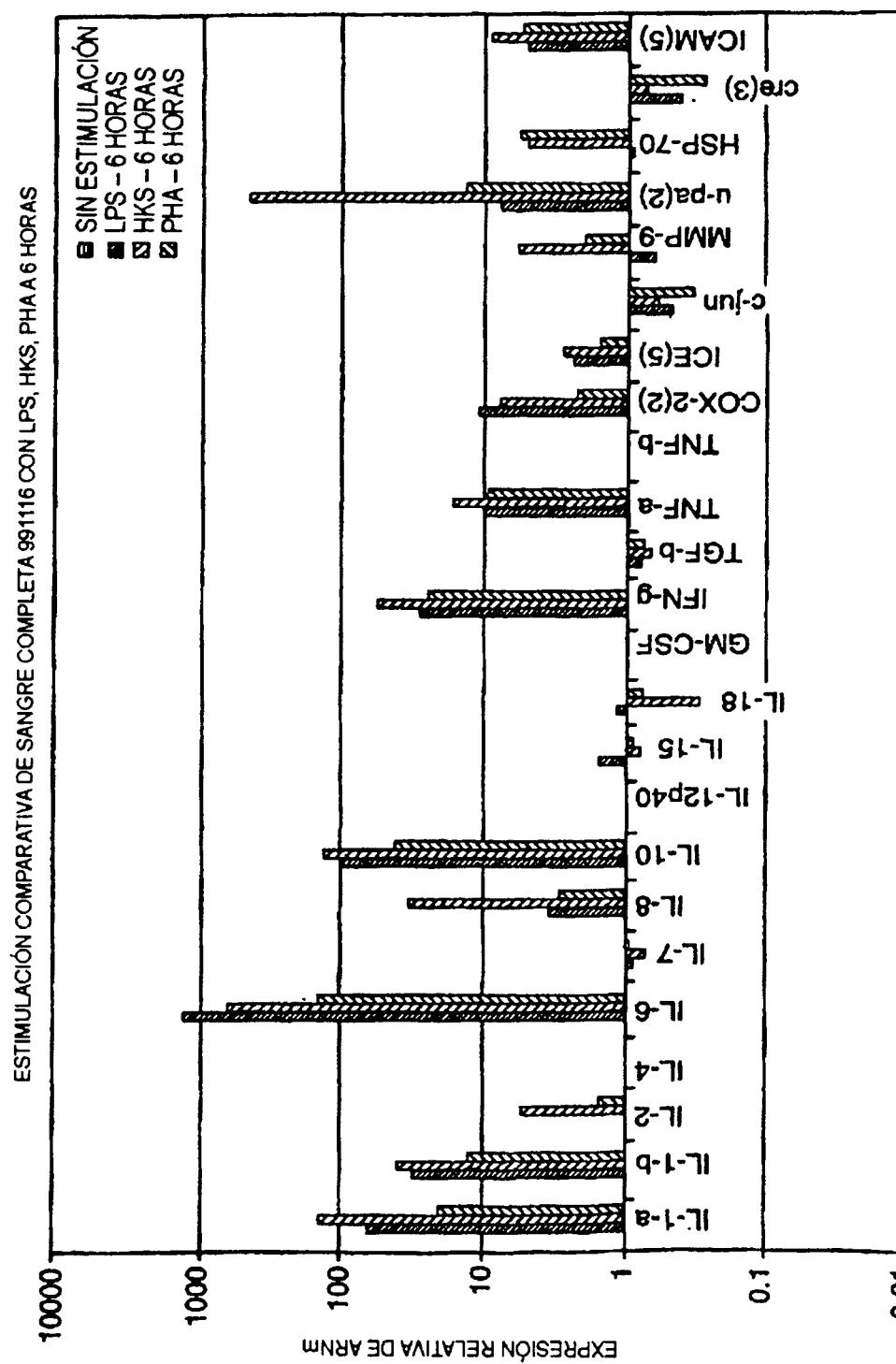


FIG. 13a

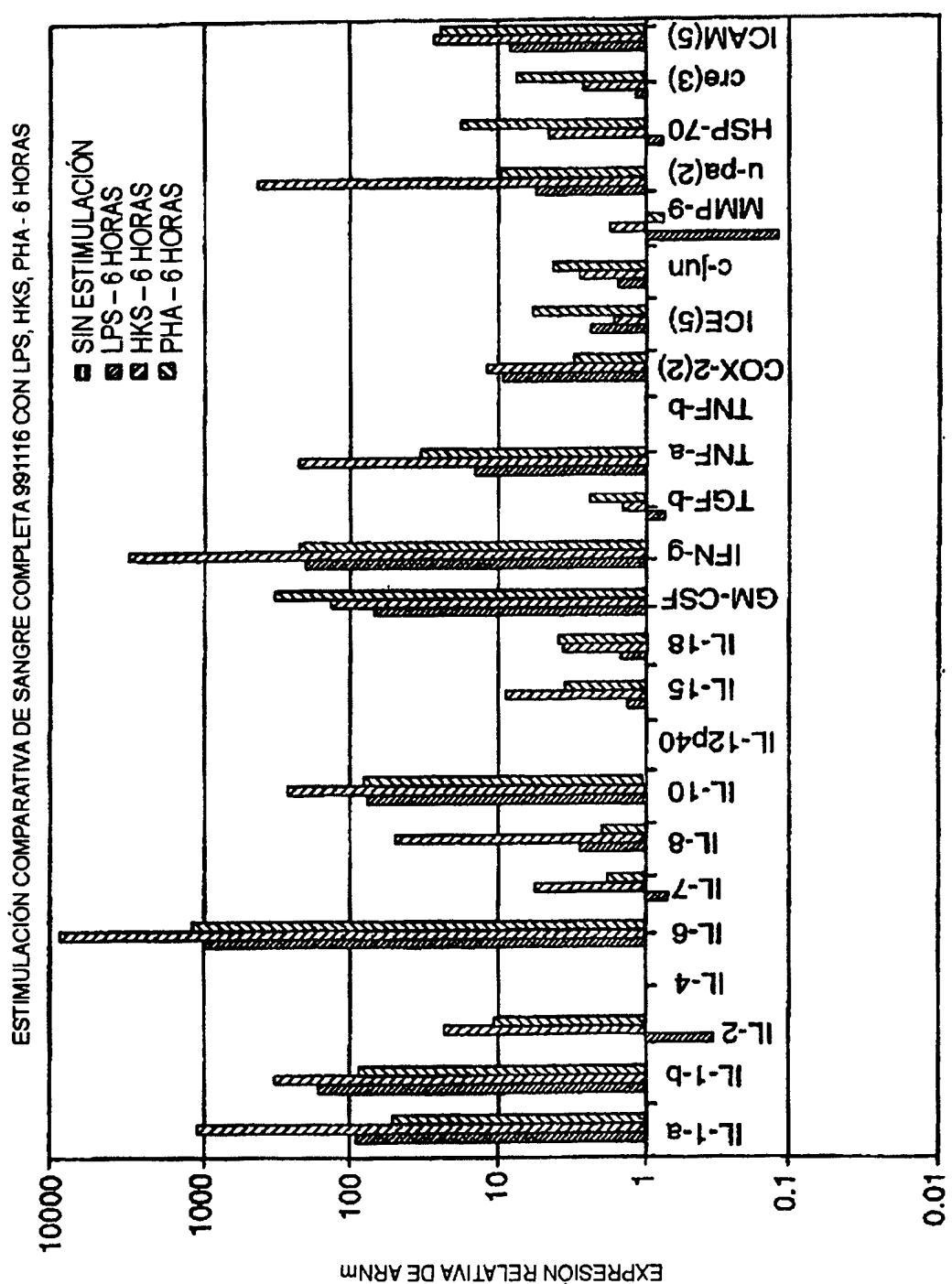


FIG. 13b

COMPARACIÓN INDIVIDUAL DE ESTIMULACIÓN CON LPS • 991026 FRENTE A 991116; DONANTE: TK

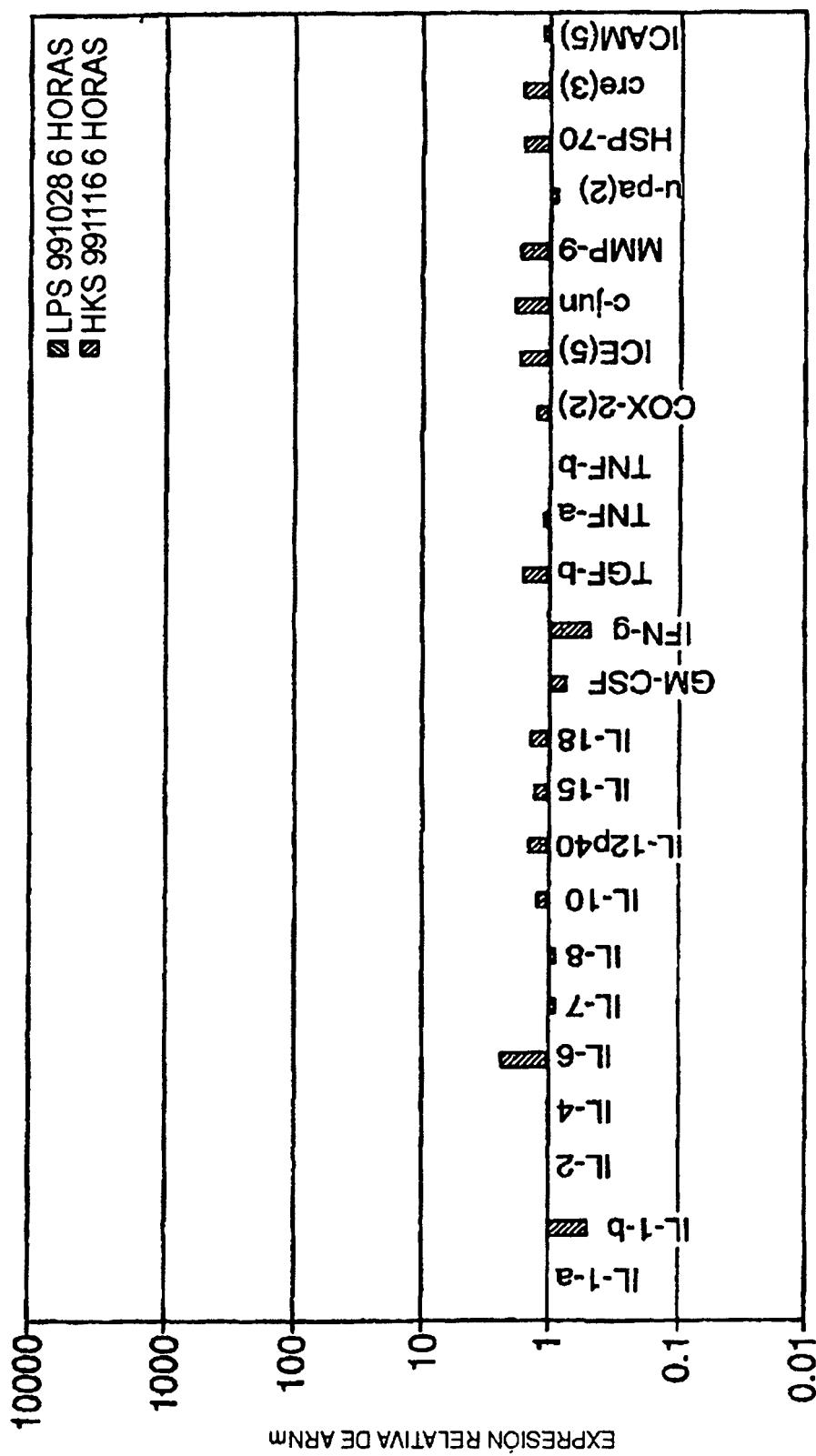


FIG. 13C

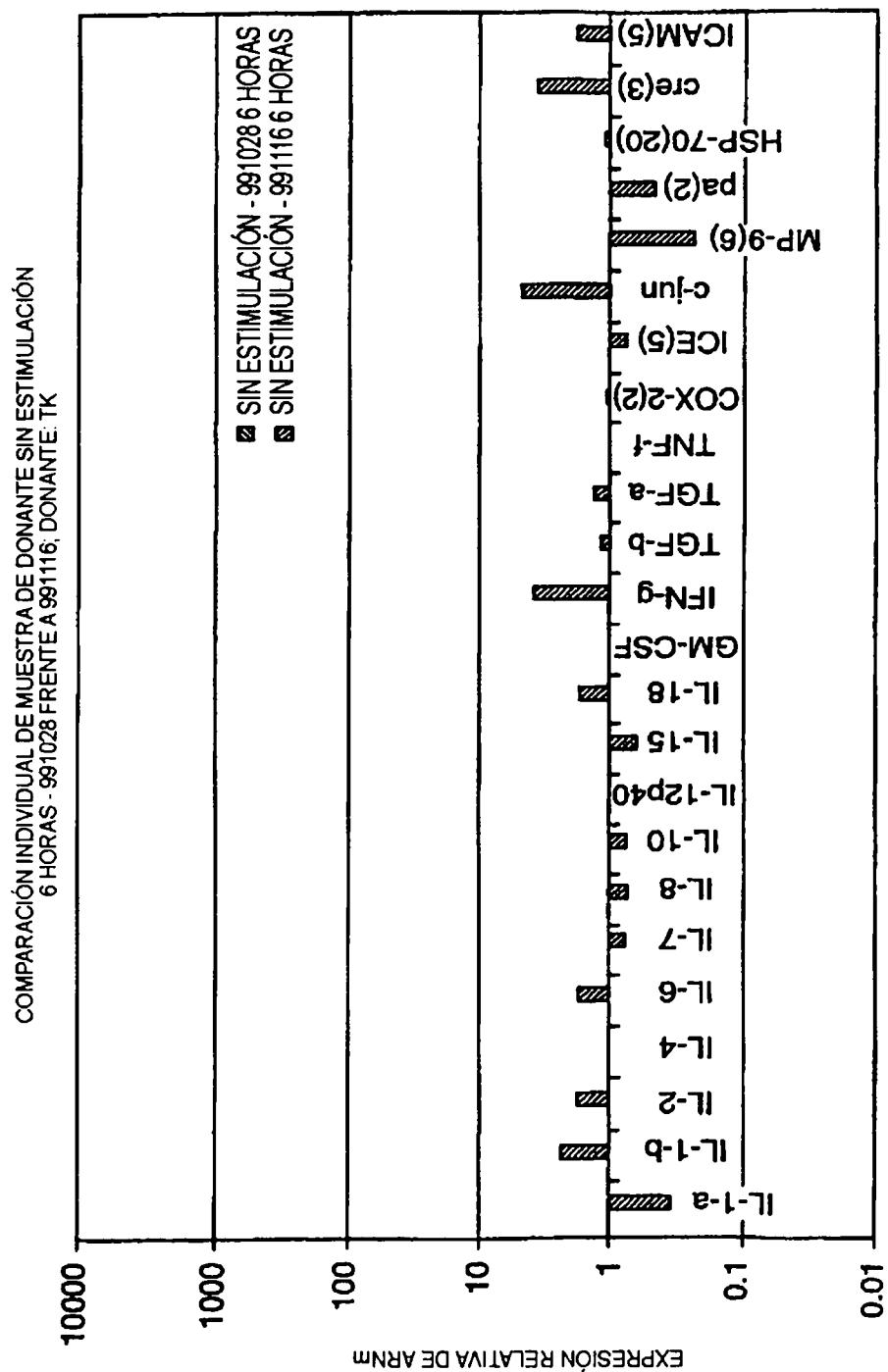


FIG. 13d

FIG. 14

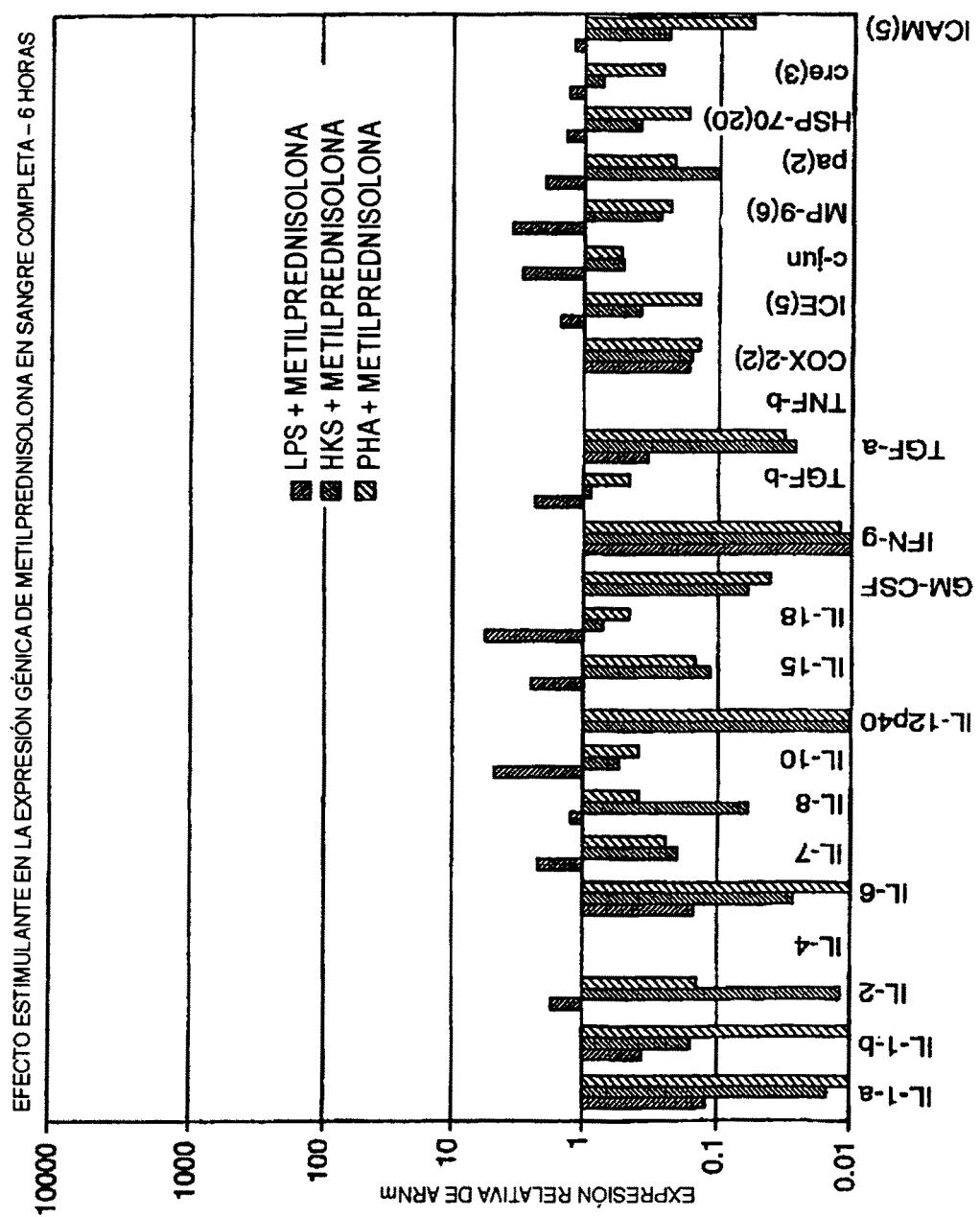
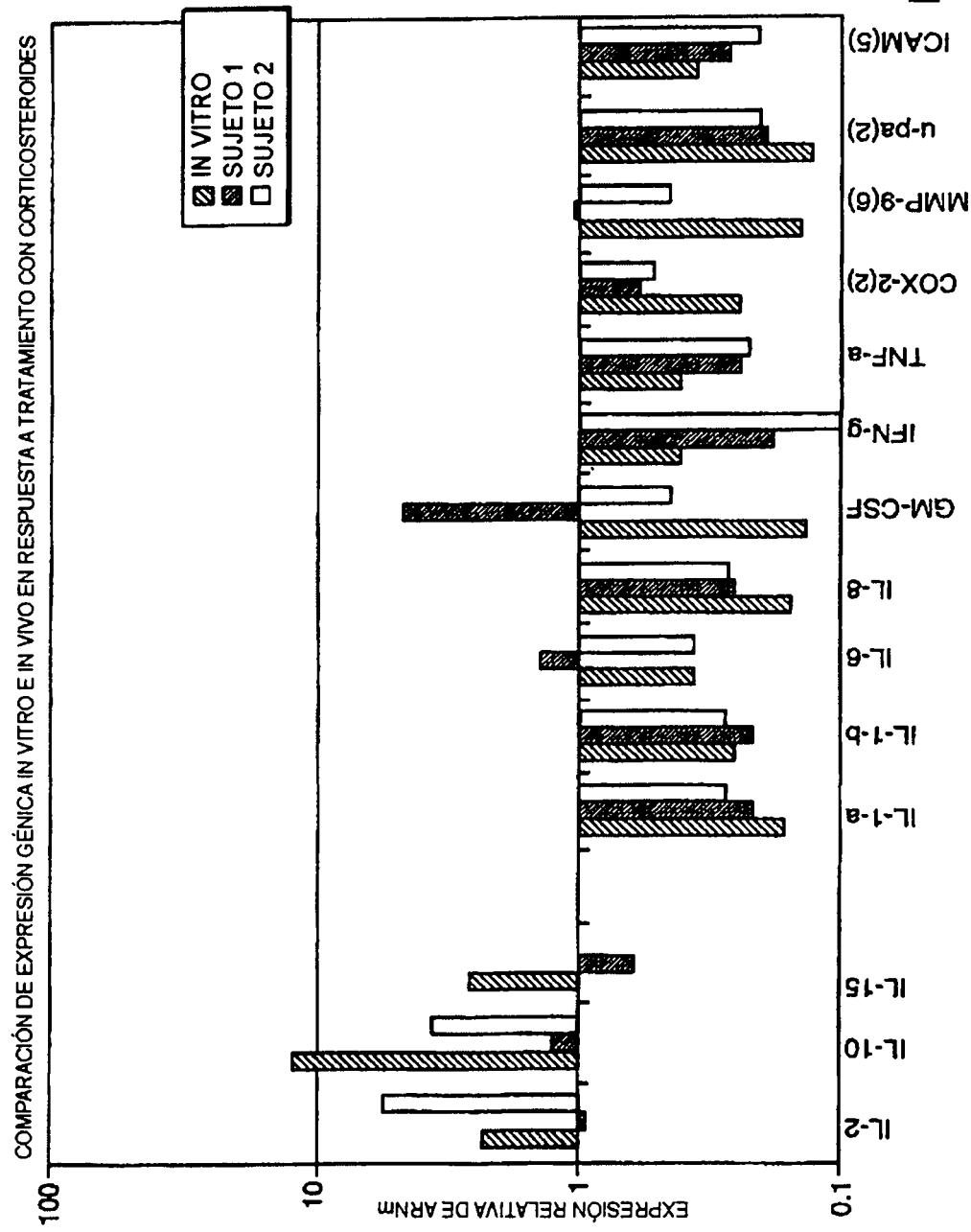


FIG. 15



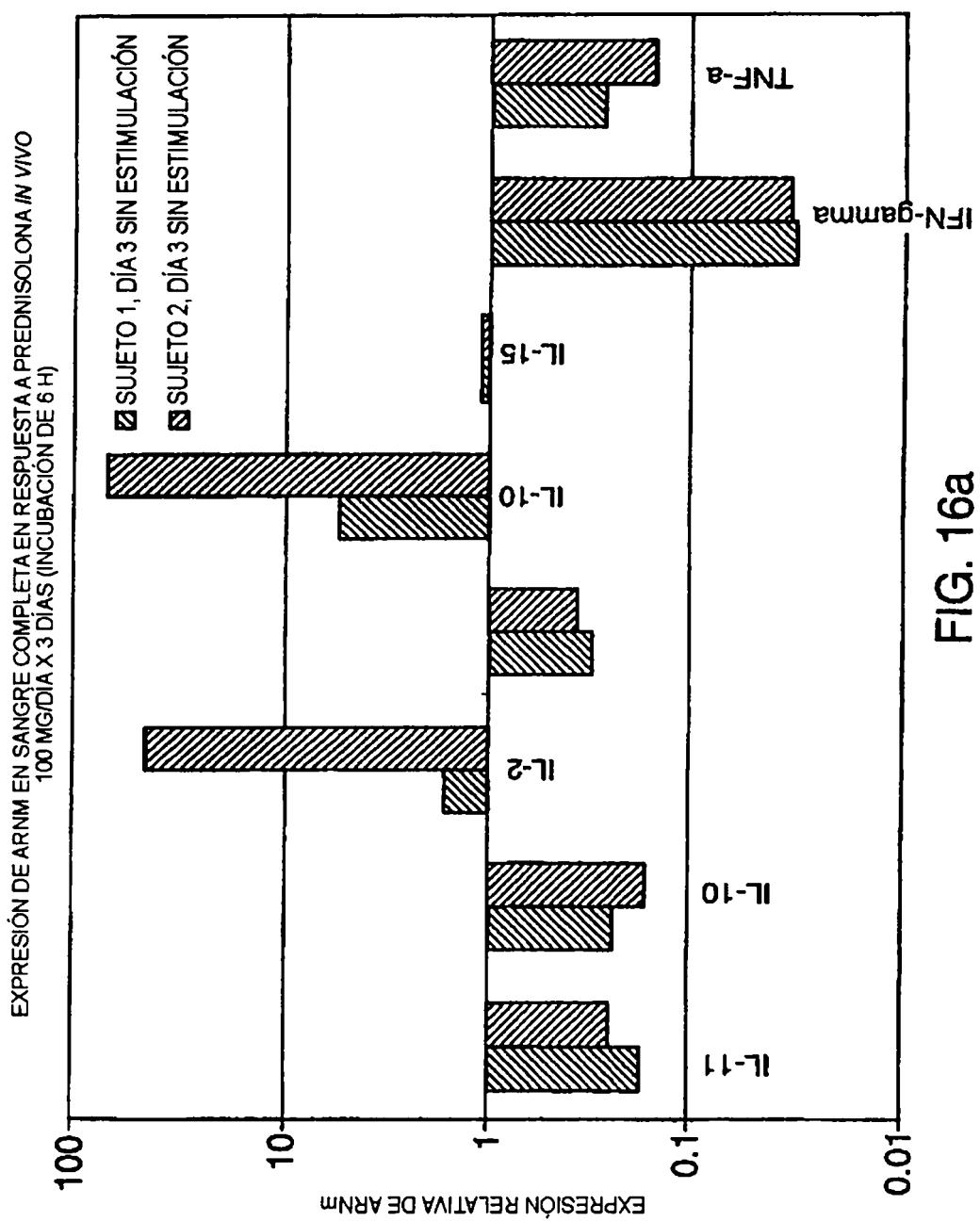


FIG. 16a

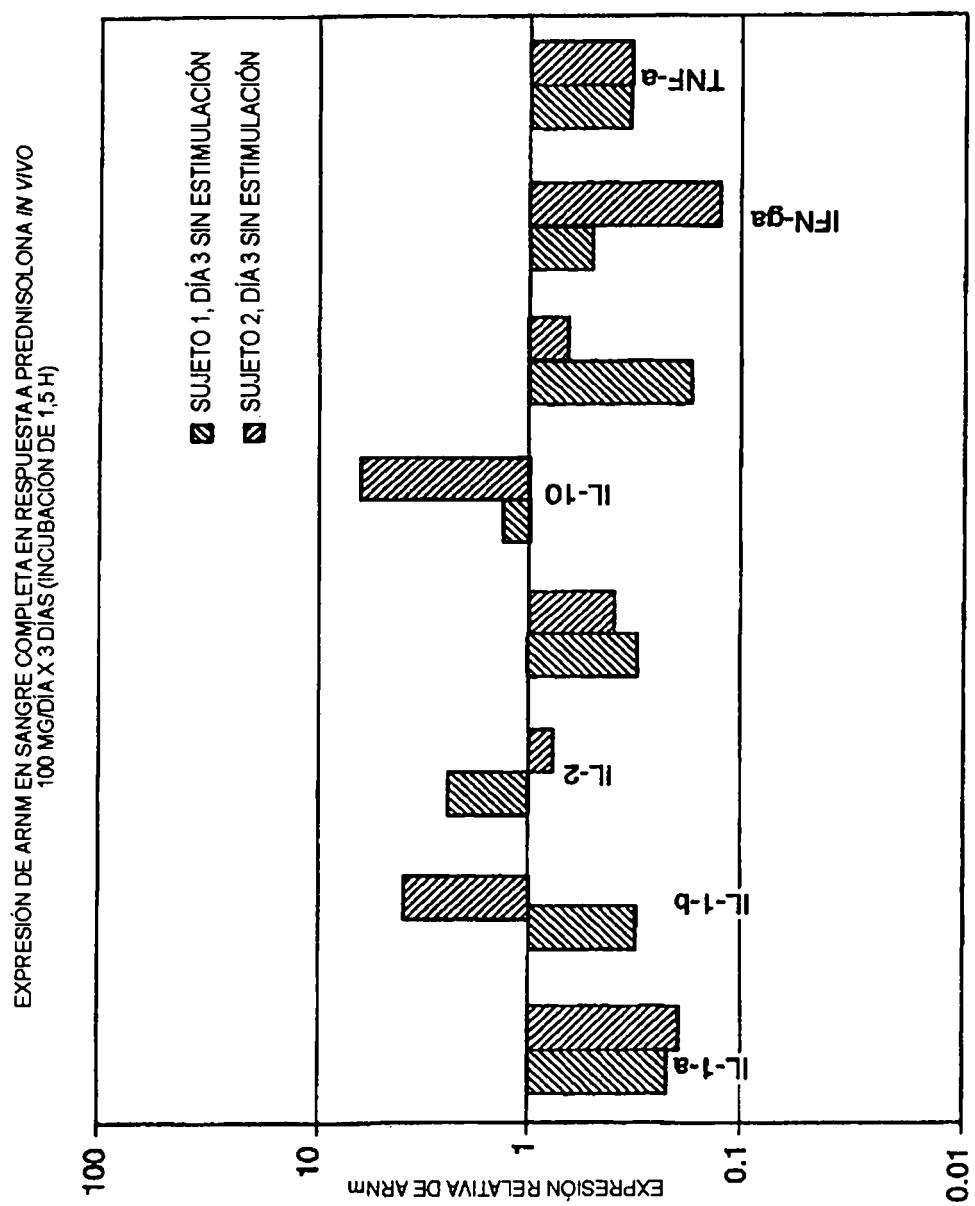
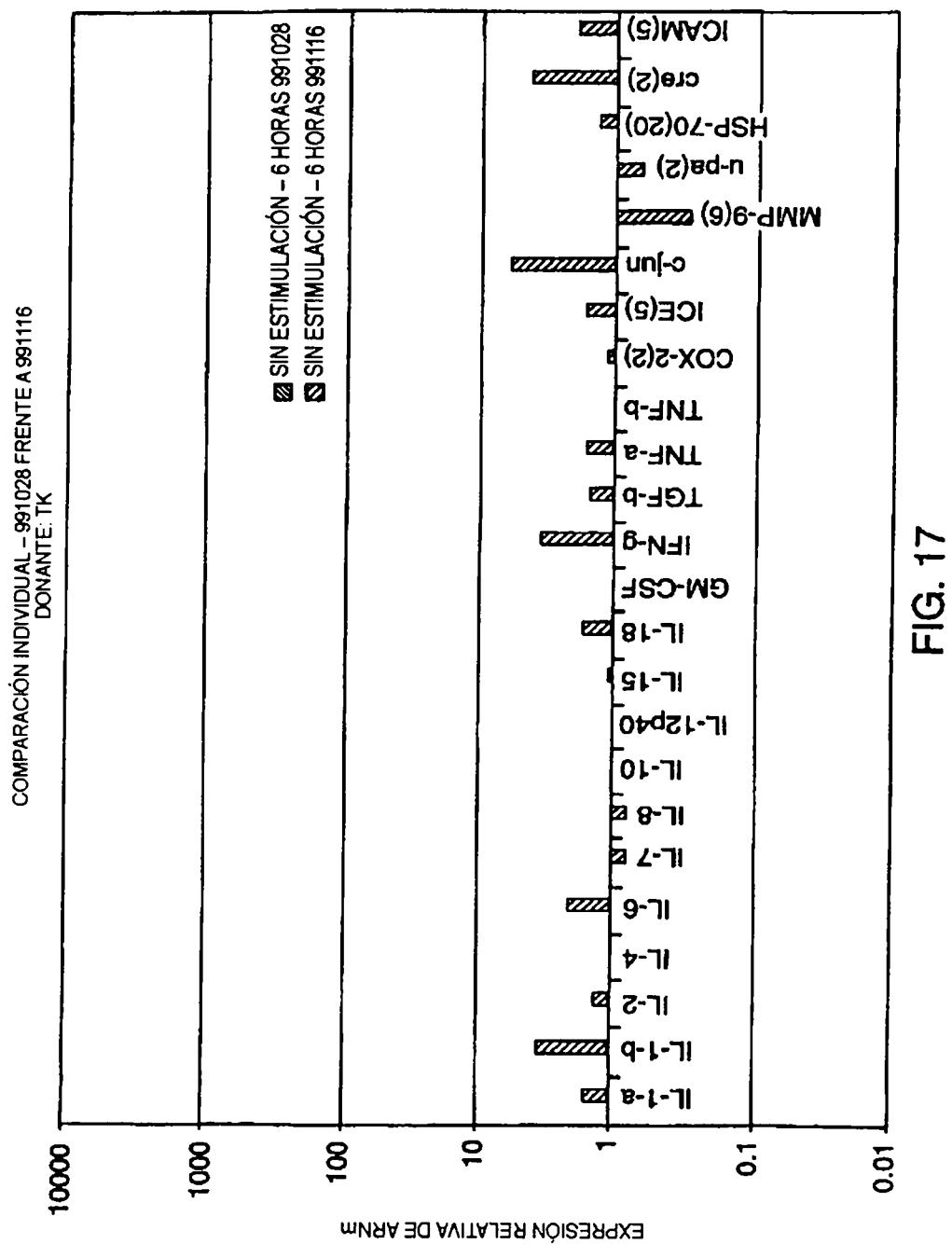


FIG. 16b



PB001 ESTUDIO 2, FASE 3  
EFECTOS DEL FARMACO EN SANGRE COMPLETA  
DONANTE 1

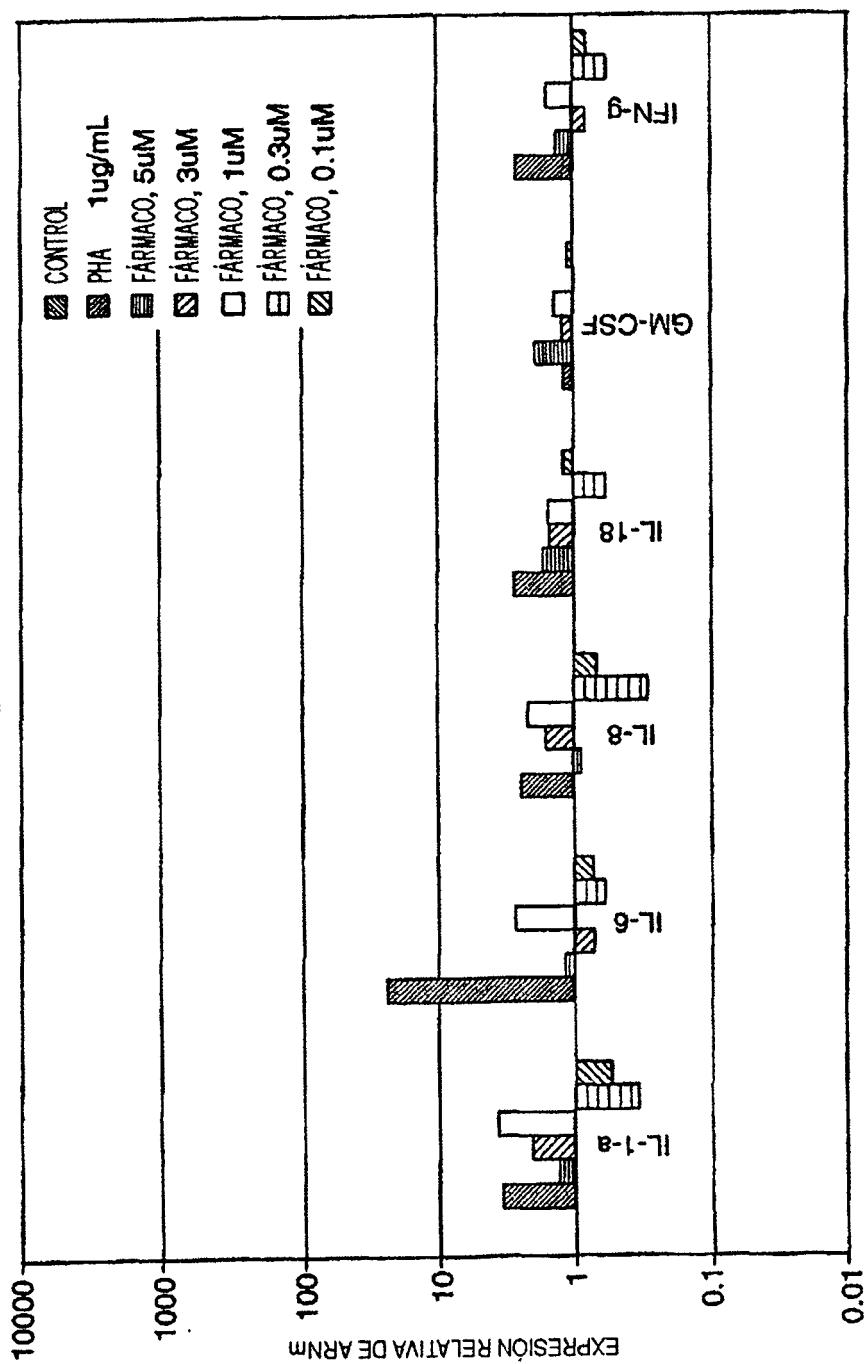


FIG. 18a

PB001 ESTUDIO 2, FASE 3  
EFFECTOS DEL FÁRMACO EN SANGRE COMPLETA  
DOMINANTE 2

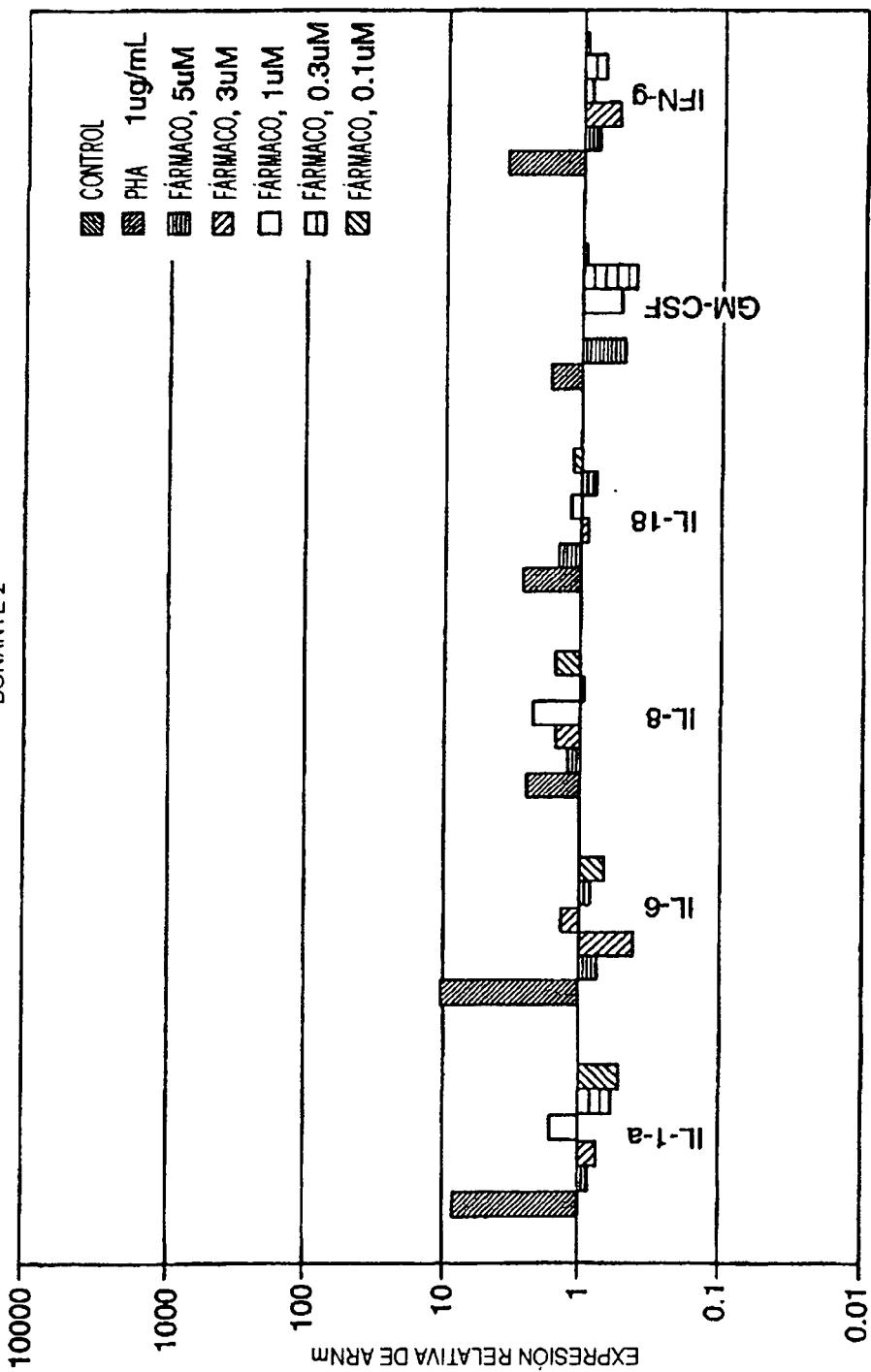


FIG. 18b

PB001 ESTUDIO 2, FASE 3  
EFECTOS DEL FÁRMACO EN SANGRE COMPLETA  
DONANTE 3

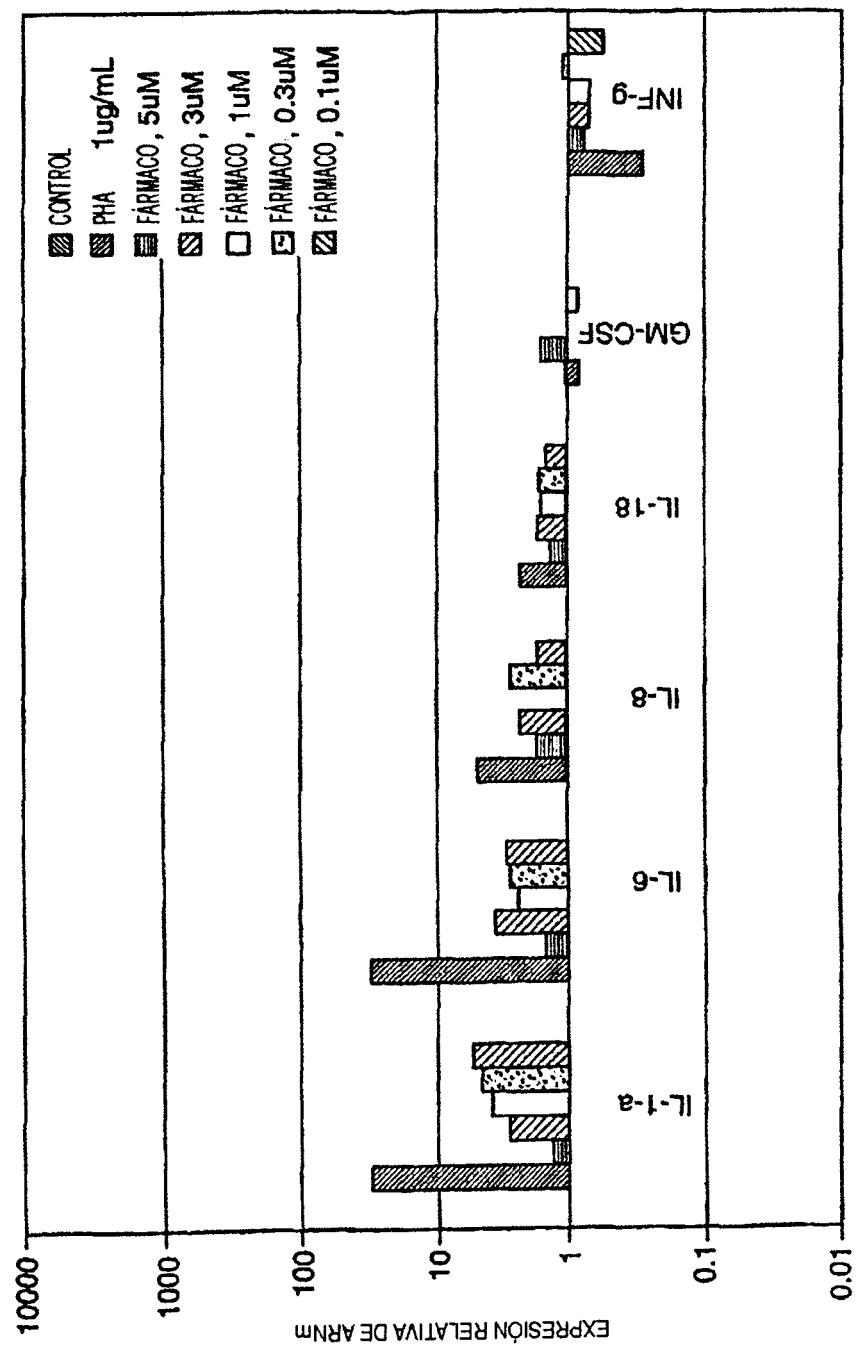


FIG. 18C

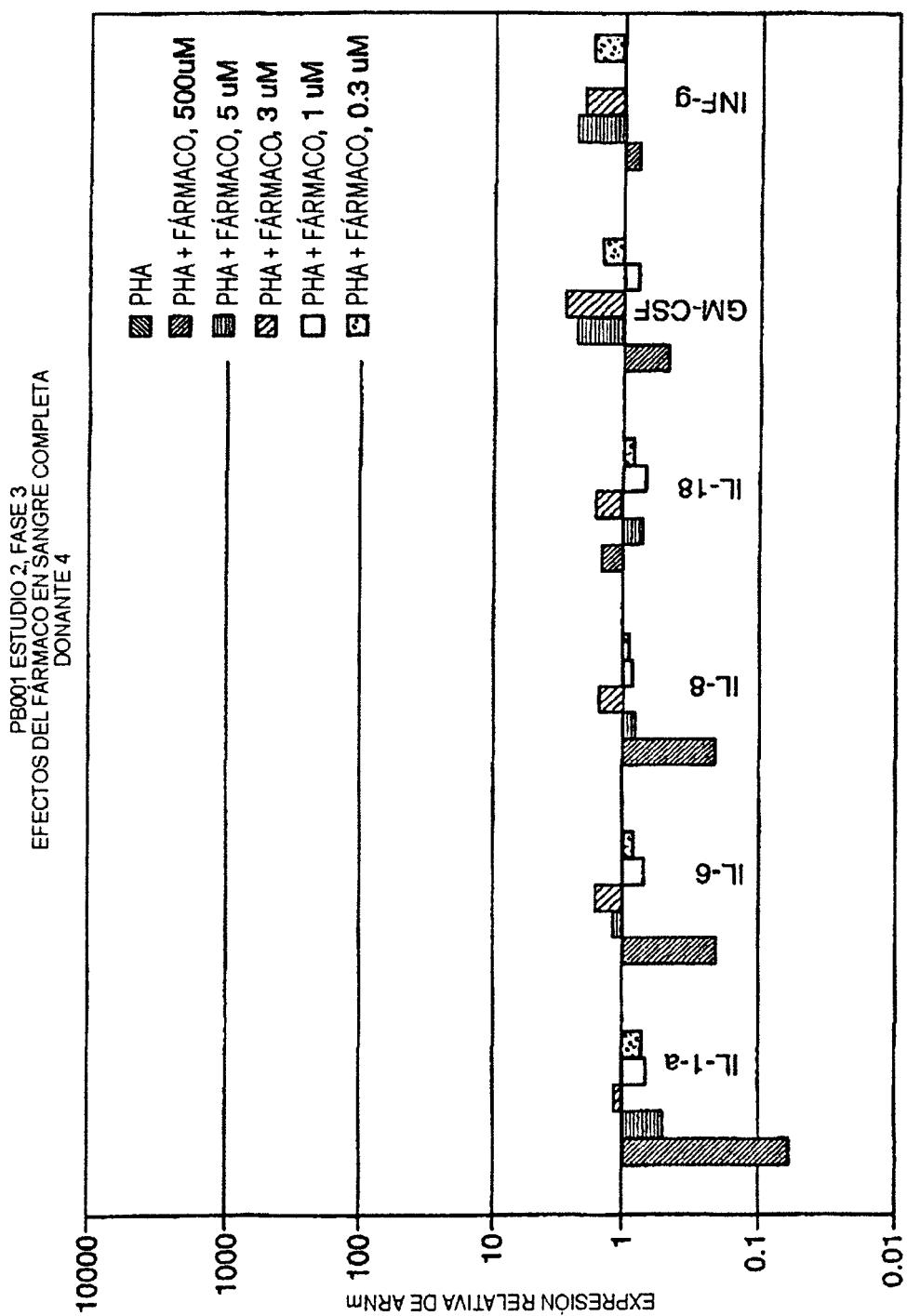


FIG. 18d

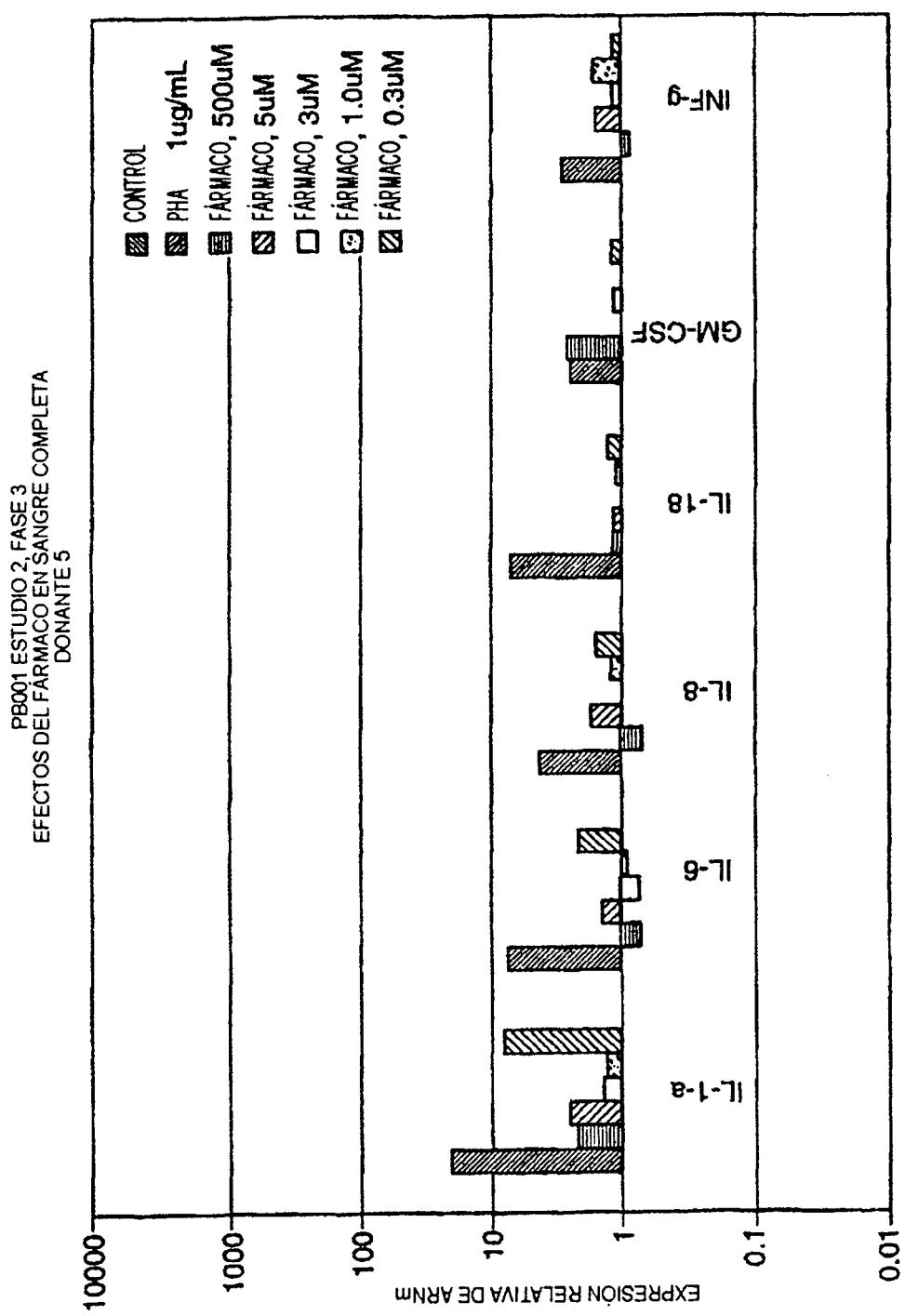


FIG. 18e

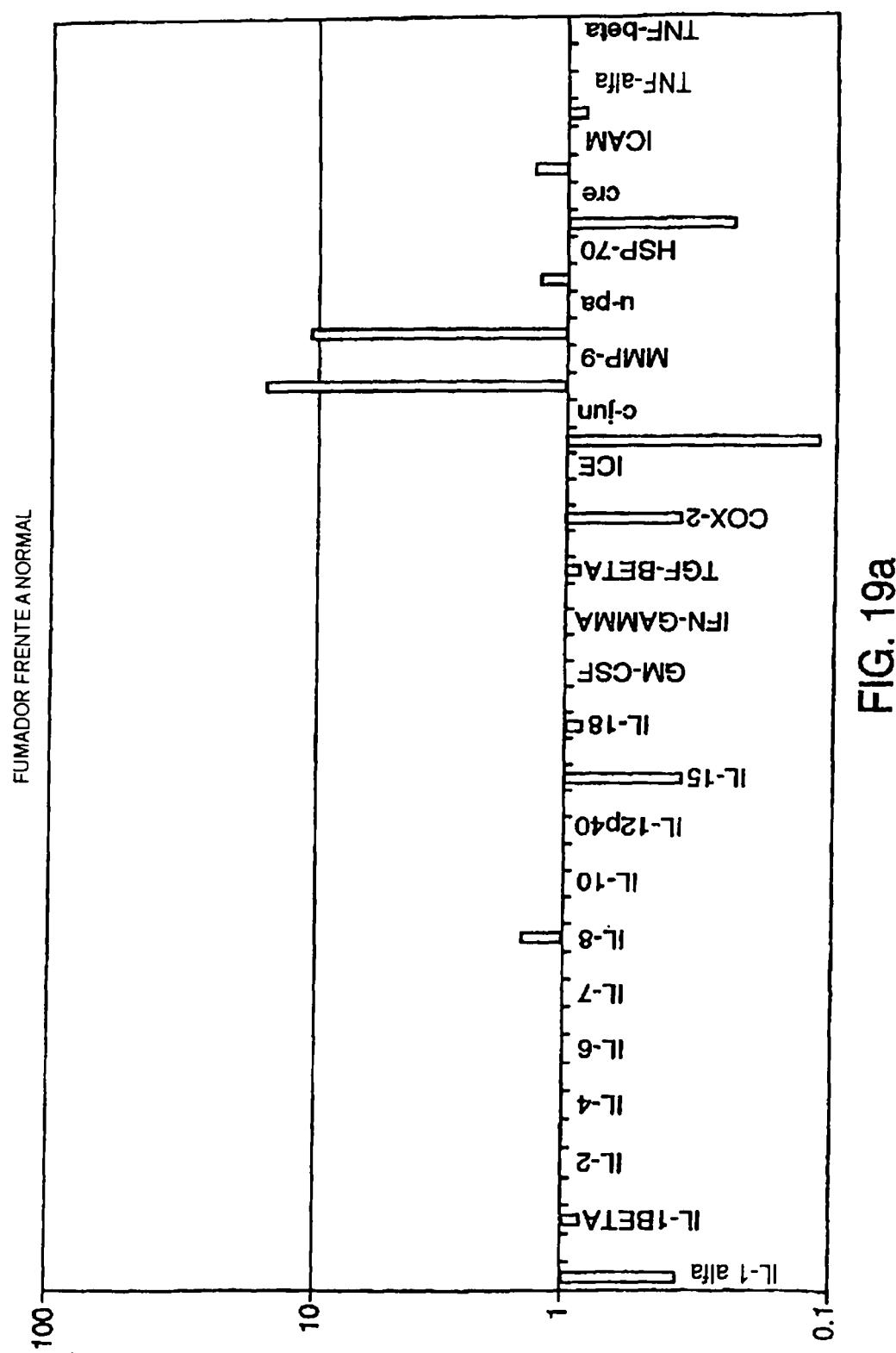


FIG. 19a

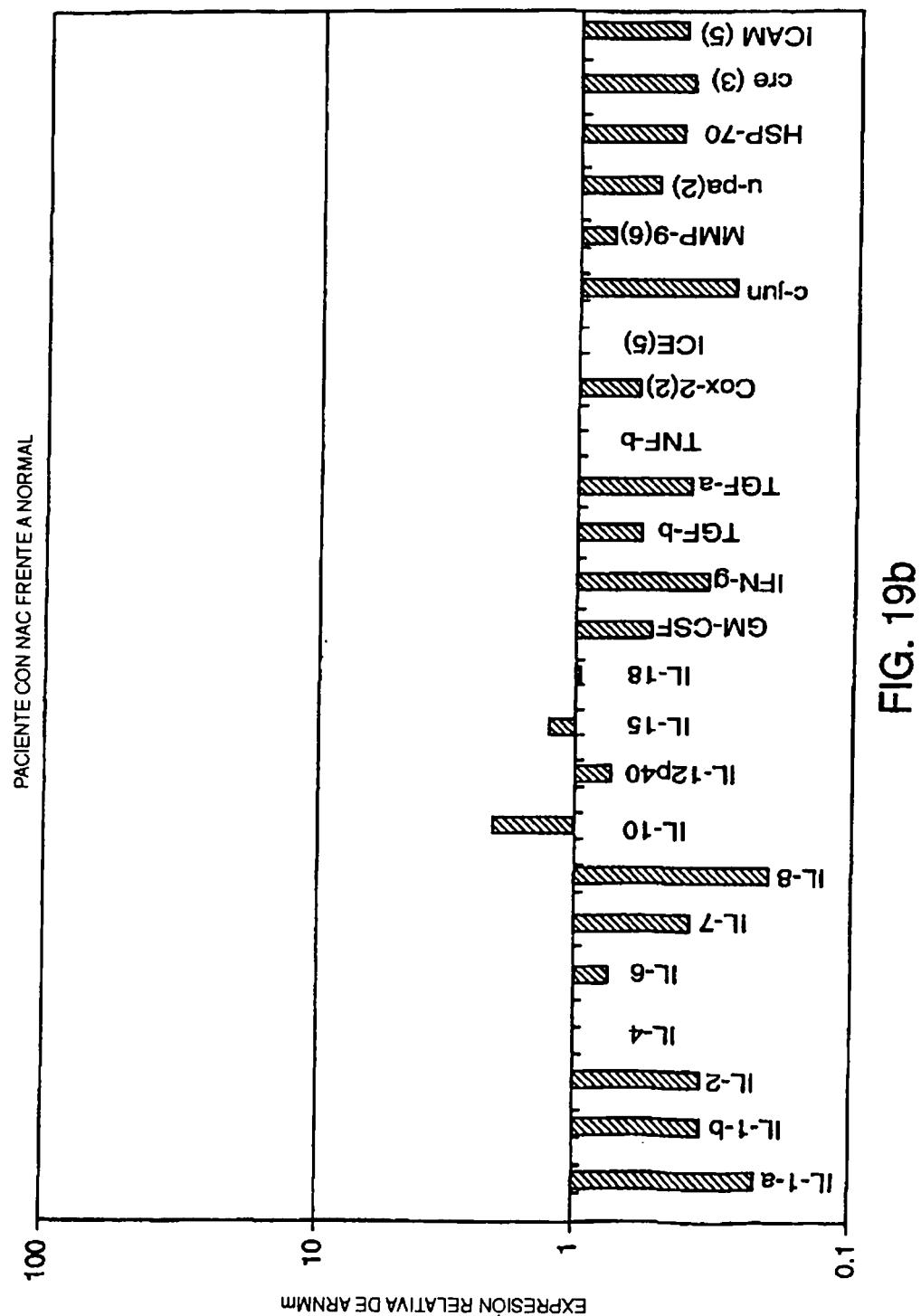


FIG. 19b

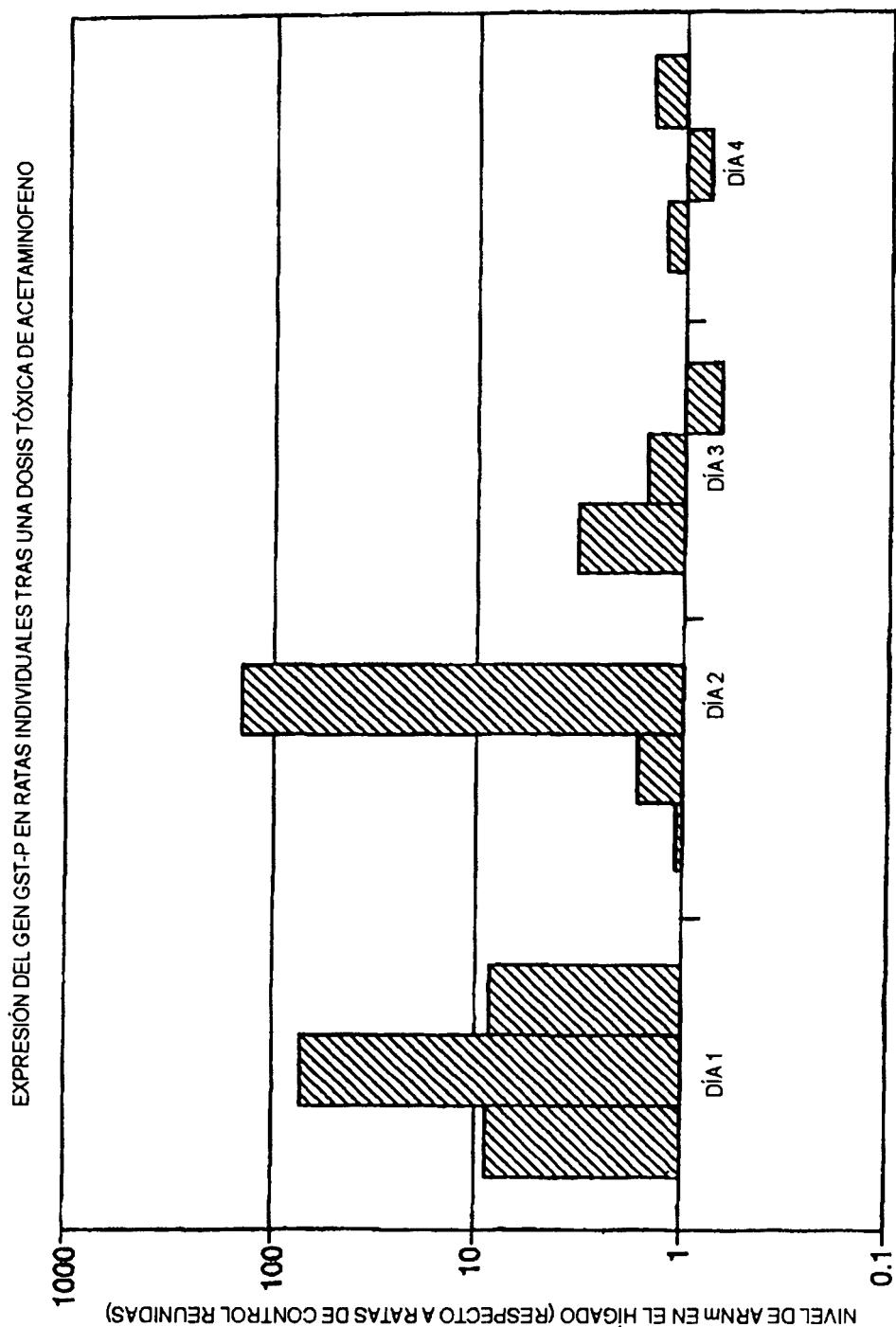


FIG. 20

EL PERFIL HERBAL COMPARATIVO MUESTRA DIFERENCIAS  
ENTRE HIERBAS ANTIINFLAMATORIAS TALES COMO  
EQUINÁCEA, ÁRNICA O GINSENG DE SIBERIA

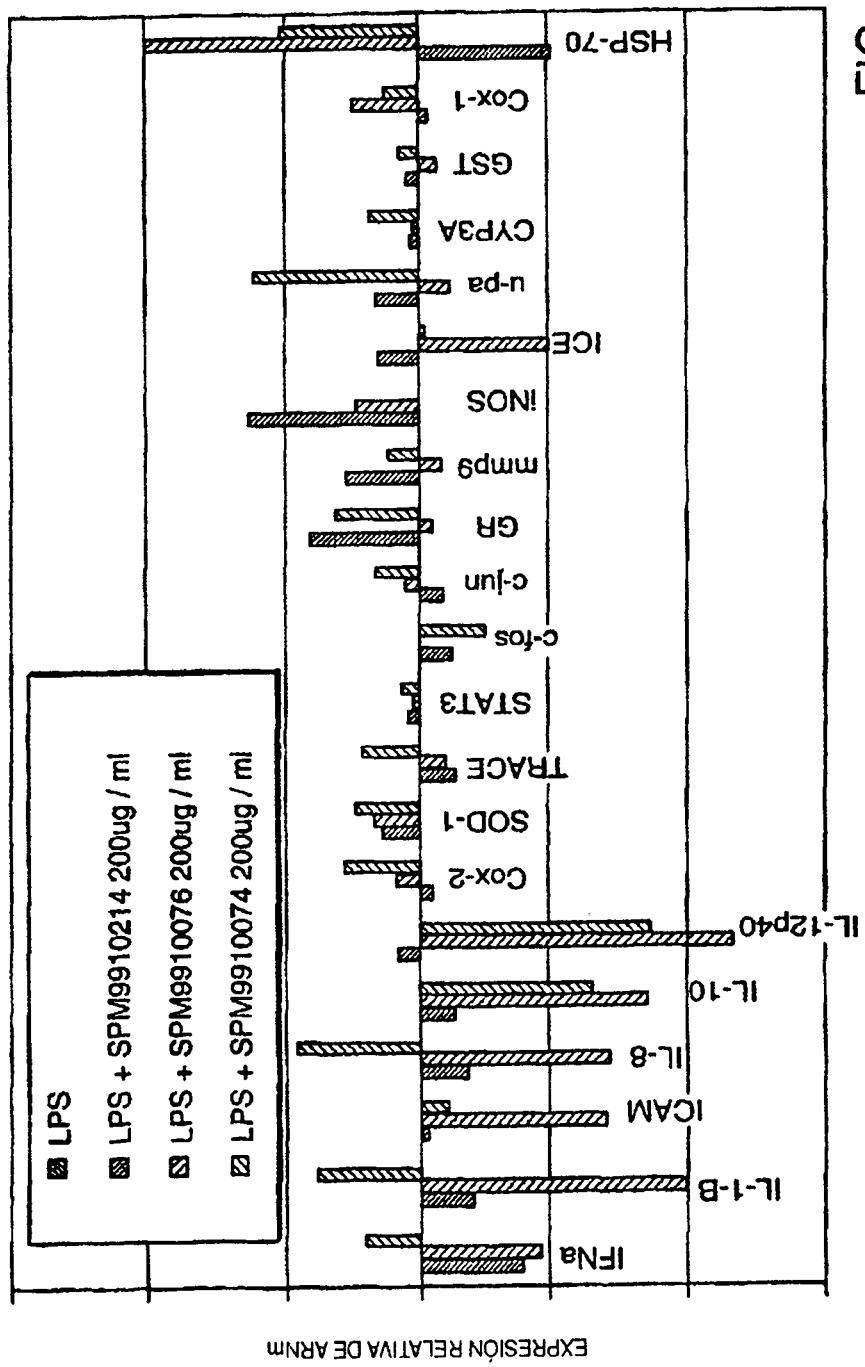
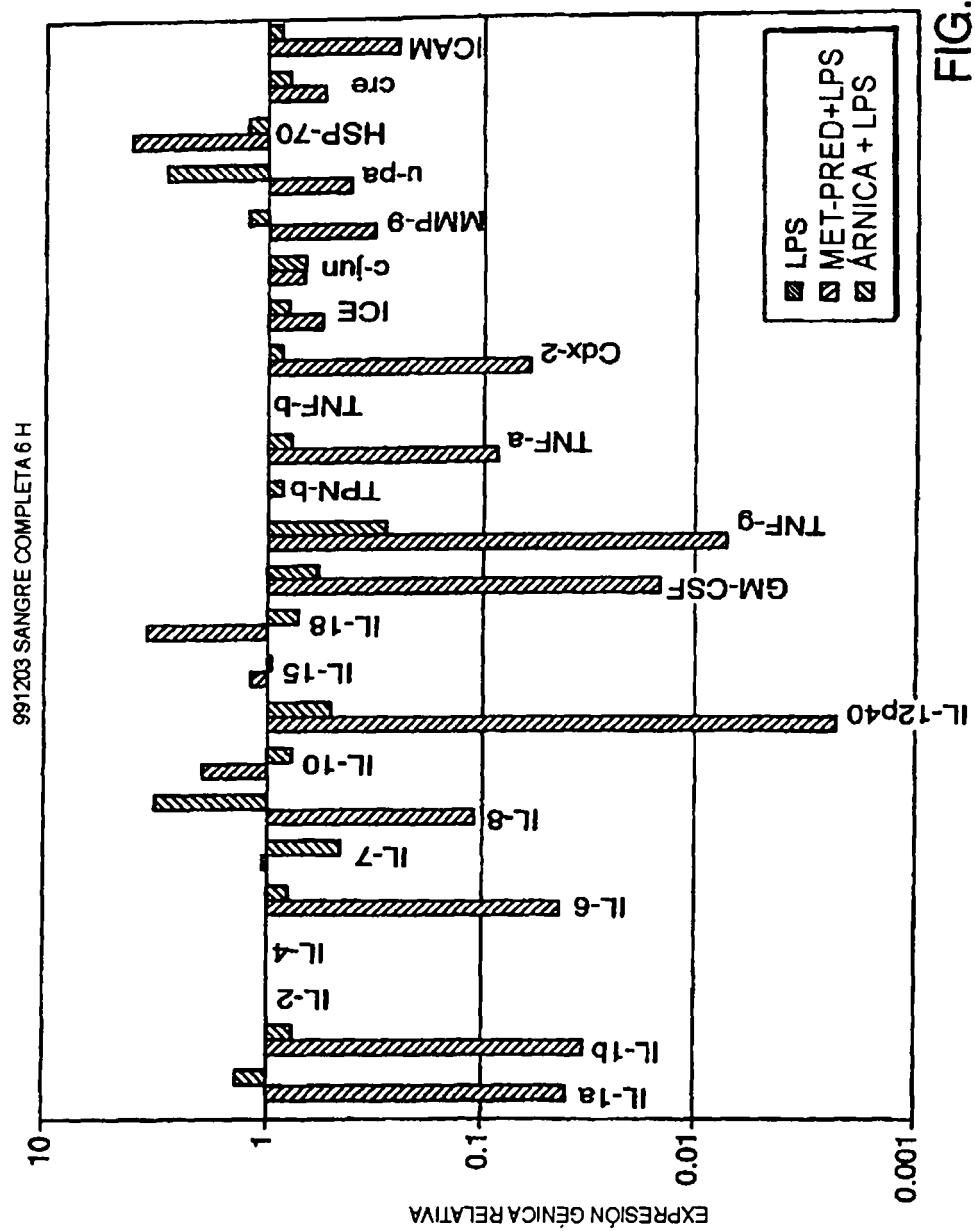


FIG. 21

FIG. 22



LOS PERFILES DE PRECISIÓN PUEDEN CORRELACIONARSE CON UNA  
RESPUESTA DE DOSIS PARA UNA HIERBA DADA

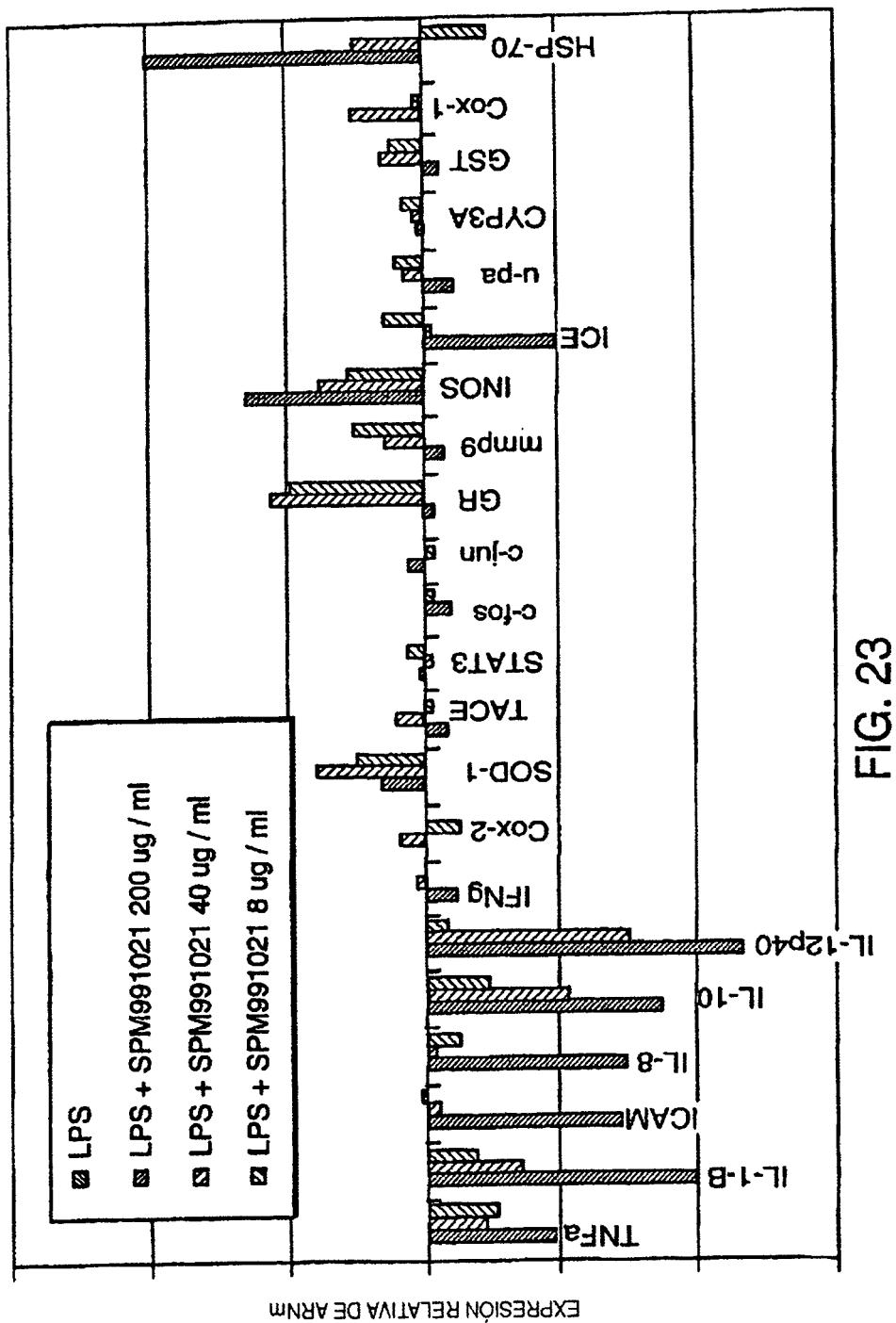


FIG. 23

LOS PERFILES DE PRECISIÓN REVELAN CONTAMINACIÓN CON  
ENDOTOXINA ENTRE DIFERENTES TIPOS COMERCIALES  
COMO SE REVELA EN SPM010 Y SPM016

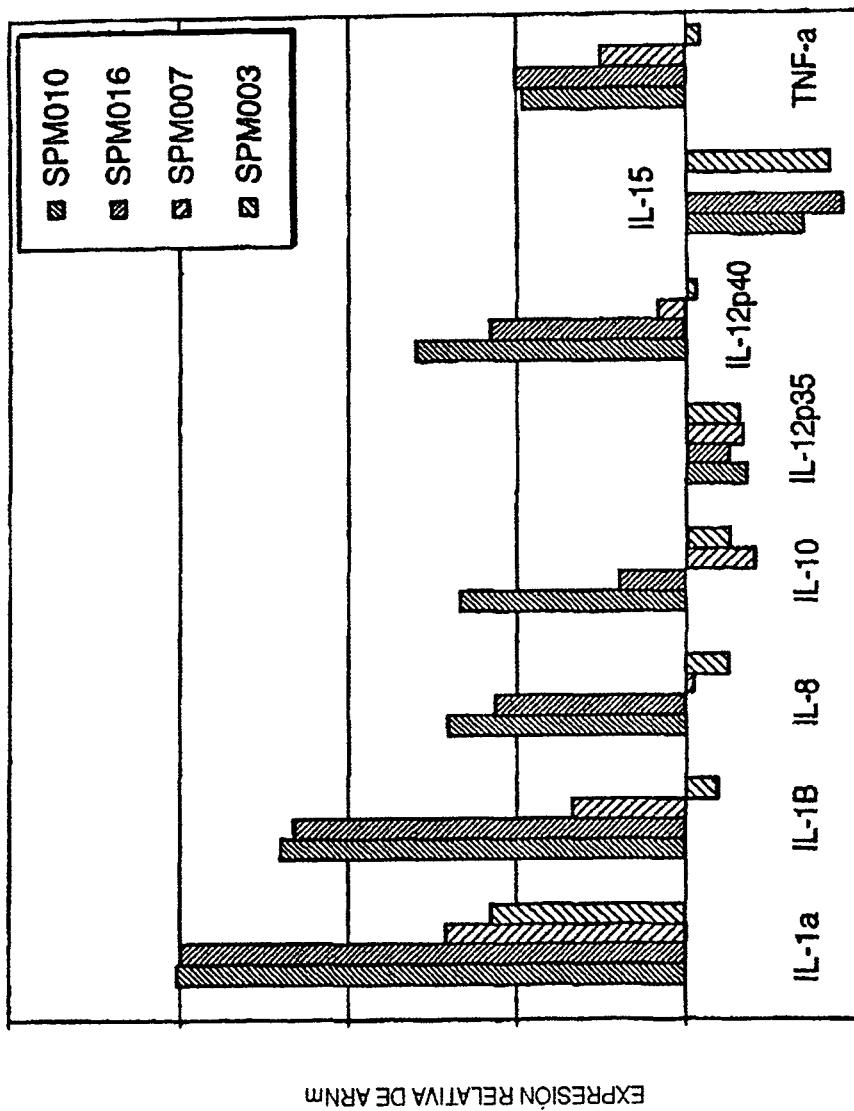


FIG. 24

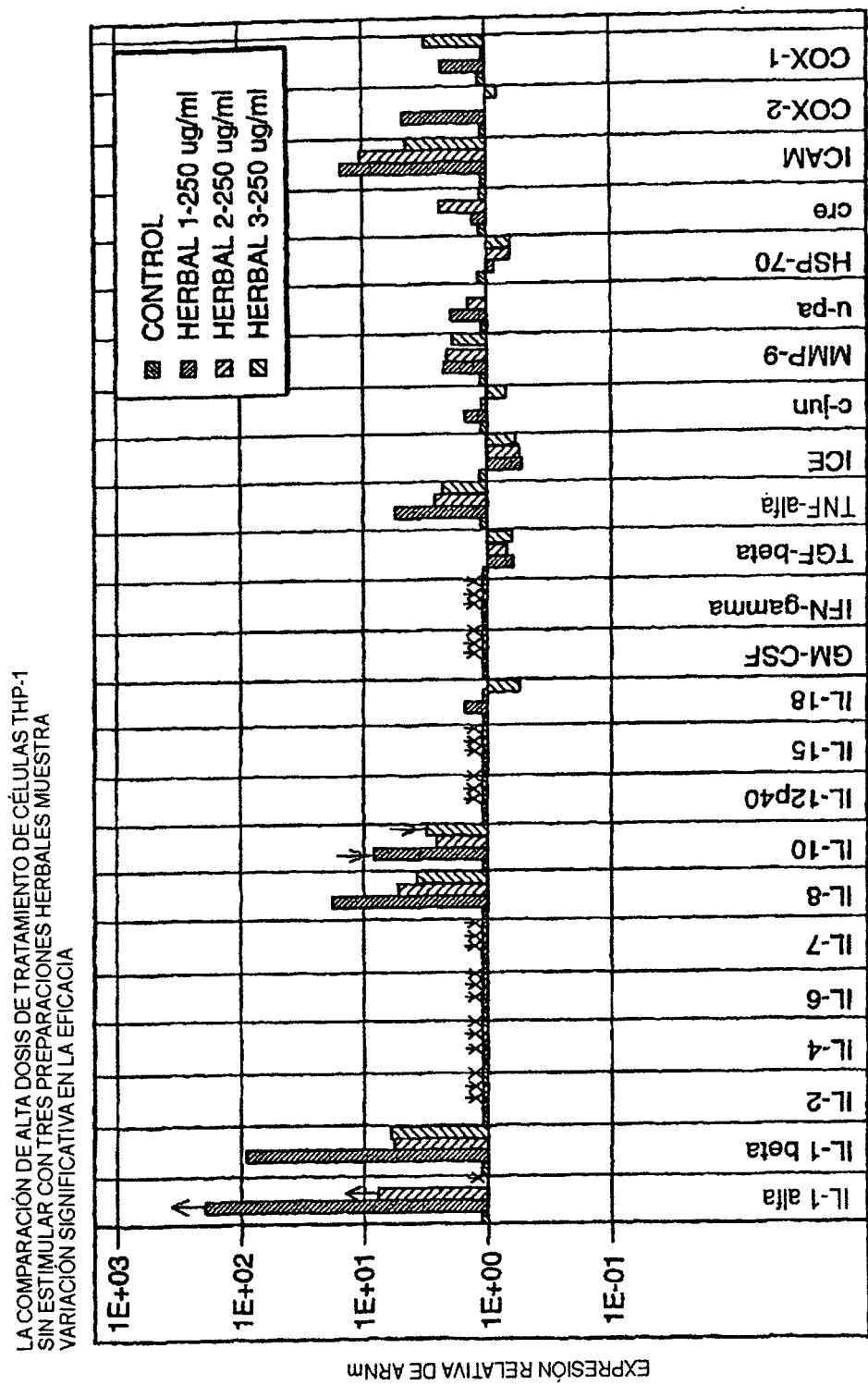


FIG. 25a

EL TRATAMIENTO DE CÉLULAS THP-1 SIN ESTIMULAR CON UNA UNICA HIERBA MUESTRA UNA BUENA RESPUESTA DE DOSIS ENTRE UN SUBCONJUNTO DE GENES

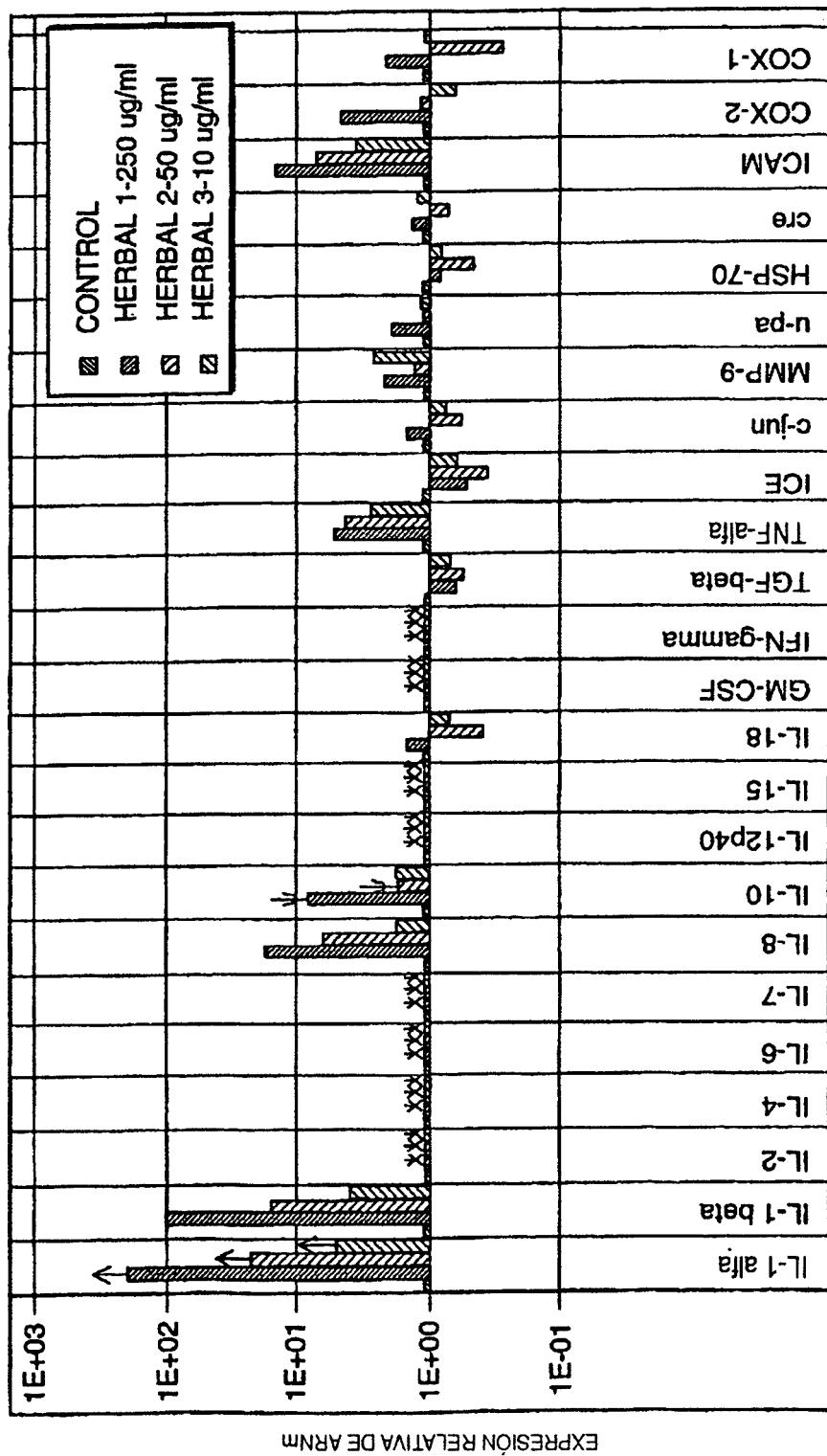


FIG. 25b

